

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE VOIES DE SIGNALISATION APOPTOTIQUES SUITE À DIVERS
STRESS
DANS LES CELLULES NEURO 2A

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
OLIVIER DIDUR

JANVIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciements

Un grand merci à tous ceux qui sont intervenus pour me permettre de réaliser ce travail de recherche...après tant de travail et d'effort, je vois la lumière au bout...

Merci au Dr Diana Averill pour m'avoir permis d'accomplir une maîtrise dans son laboratoire, pour son support, ses conseils ainsi que pour le financement au cours de ce projet.

Merci au x membres du l'équipe du Dr Averill pour leurs conseils et instructions tout au long de ce projet.

Un énorme remerciement au Dr Joanne Paquin pour m'avoir encadré et conseillé dans la rédaction de ce mémoire

Et dernièrement, merci à ma famille, mes amis et ma copine Lidia, qui ont su comprendre mes besoins en temps et en énergie pour réussir mon projet, et qui m'ont épaulé.

Merci

Table des matières

Remerciements	ii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
 Résumé	 xiii
I- Introduction	1
 1. Mort cellulaire par nécrose et apoptose	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Apoptose	2
1.2.1 Structure et fonction des caspases.....	3
1.2.2 Voie mitochondriale.....	5
1.2.2.1 Le cytochrome C	6
1.2.2.1.1 Perméabilité membranaire de la mitochondrie selon la famille Bcl-2	7
1.2.2.1.2 Les transitions de perméabilité mitochondriale (MPT)	8
1.2.3 Voie des récepteurs de mort.....	8
1.2.4 Voie de t-Bid	9
 2. Facteur Nucléaire-κB (NF-κB).....	10
2.1 Généralités.....	10
2.1.1 Les constituants de NF- κ B	10

2.2 Régulation de NF- κ B par I κ B	12
2.3 Voies d'activation de NF- κ B	14
2.3.1 Voie classique de NF- κ B	14
2.3.2 Voie alternative de NF- κ B	14
2.4 Les effets de NF- κ B lors de l'induction de l'apoptose	16
3. Maladie d'Alzheimer	18
3.1 Généralités.....	18
3.1.1 Évolution de la maladie.....	19
3.2 Forme familiale et sporadique.....	19
3.3 Maladie d'Alzheimer et apoptose	21
3.4 La maladie d'Alzheimer et stress oxydatif.....	22
3.4.1 Oxydation lipidique.....	23
3.4.2 Oxydation protéique.....	24
4. Choc thermique et mécanisme de survie cellulaire.....	25
4.1 Généralités.....	25
4.2 Phénomène de thermotolérance	26
4.3 Les constituants de la famille des HSP	27
4.3.1 Les HSP70.....	27
4.3.2 Les HSP90.....	30
4.3.3 Les HSP27.....	31

4.3.4 Ubiquitine.....	31
5. Le cancer	32
5.1 Généralités.....	32
5.2 Facteurs de risque.....	34
5.2.1 Les facteurs environnementaux.....	34
5.2.1.1 Les radiations	34
5.2.1.1.1 Les radiations non ionisantes	35
5.2.1.1.2 Les radiations ionisantes	35
5.2.1.2 Les stress chimiques.....	37
5.2.2 Les mauvaises habitudes de vie	37
5.2.2.1 Le tabagisme	38
5.2.2.2 La mauvaise alimentation	38
5.2.3 Modifications génétiques et inhibition des systèmes de réparation de l'ADN.....	39
5.3 Le cancer et NF- κ B	41
5.4 Rôle des HSP lors de la formation de carcinome.....	43
5.4.1 Invasion et métastase grâce aux HSP.....	45
5.4.2 Traitement possible de cancer lié aux HSP90.....	45
6. Cellules Neuro 2A.....	47
7. Objectifs du projet	49

II. Matériels et méthodes.....	52
1. Culture cellulaire.....	52
2. Stress oxydatif.....	53
3. Stress par choc thermique	53
4. Cinétique d'activité des caspases	54
5. Condensation de la chromatine	55
6. Potentiel membranaire mitochondrial	57
7. Électrophorèse SDS-PAGE et buvardage de type western	58
8. Statistiques	59
III. Résultats	60
1. L'activation de l'apoptose par un stress oxydatif n'est que très légèrement affectée par Bay 11-7082.	60
2. L'activation de l'apoptose par un stress thermique est affecté par le Bay 11-7082.	62
3. Le stress oxydatif induit l'apoptose par l'activation de la caspase 9.	64
4. Le stress thermique induit l'apoptose par l'activation de la caspase 9.	66
5. Le choc thermique mais non le H ₂ O ₂ active la caspase 3.	68
6. Le H ₂ O ₂ mais non le choc thermique active la caspase 6.	70
7. L'activation de la caspase 6 par le H ₂ O ₂ entraîne le clivage de la lamine A	72
8. Le H ₂ O ₂ et le choc thermique causent une dépolarisation des membranes mitochondriales.....	75

IV. Discussion et conclusion	77
V. Bibliographie	86

Liste des figures

Figure 1. 1 Voies apoptotiques médiées par les caspases.	6
Figure 1. 2: Mécanisme d'activation du dimère de NF- κ B.....	13
Figure 1. 3: La voie d'activation de IKK/NF- κ B dépend du stress initiateur.....	15
Figure 1. 4: Relation entre l'activation des caspases, l'induction de l'apoptose, la présence de radicaux libres ainsi que l'inhibition qu'exerce NF- κ B sur ces systèmes	16
Figure 1. 5: Facteurs pouvant stimuler la synthèse de l'Apo-E ₄ et du peptide A β	21
Figure 1. 6: Les HSP27 et 70 et l'apoptose.....	29
Figure 1. 7: Inflammation, activation de NF- κ B et la croissance ou la mort tumorale.	42
Figure 1. 8: Implication des HSP90 dans la stabilisation de protéines mutantes.....	44
Figure 1. 9 : Photographie de cellules Neuro 2A à 80% de confluence.....	48
Figure 3. 1: Condensation de la chromatine dans les cellules Neuro 2A exposées au H ₂ O ₂ avec et sans prétraitement avec le Bay 11- 7082.....	61
Figure 3. 2: Condensation de la chromatine dans les cellules Neuro 2A exposées à un choc thermique avec et sans prétraitement avec le Bay 11-7082.....	63
Figure 3. 3: Activité des caspases 8 et 9 dans les cellules Neuro 2A exposées au H ₂ O ₂	65
Figure 3. 4: Activité des caspases 8 et 9 dans les cellules Neuro 2A exposées à un choc thermique (37° à 43°C).....	67

Figure 3. 5: Activité de la caspase 3 suite à un stress oxydatif ou thermique dans les cellules Neuro 2A.....	69
Figure 3. 6: Activité de la caspase 6 suite à un stress oxydatif ou thermique dans les cellules Neuro 2A.....	71
Figure 3. 7: Expression de la lamine A suite à l'induction d'un stress oxydatif ou thermique.....	74
Figure 3. 8: Analyse de la polarité membranaire de la mitochondrie suite à l'induction d'un stress oxydatif ou thermique dans les Neuro 2A.....	76

Liste des tableaux

Tableau 1. 1: Liste des dimères possibles de NF- κ B et de leurs gènes-cibles	11
Tableau 1. 2: Résumé des principaux groupes des HSP, de leurs fonctions intracellulaires et de leurs co-facteurs	27
Tableau 4. 1: Résumé des résultats obtenus suite aux divers stress chez les cellules Neuro 2A.....	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique.
Apaf-1	: Facteur-1 d'activation des protéases apoptotiques.
APP- β	: Précurseur de la protéine amyloïde β .
Apo E ₄	: Apolipoprotéine de génotype E ₄ .
ATP	: Adénosine triphosphate.
ARNm	: Acide ribonucléique messenger.
Ca	: Calcium.
Caspases	: Protéases à cystéine aspartate-dépendantes.
CARD	: Domaine de recrutement des caspases.
CK	: Créatine kinase.
CPA	: Cellule présentatrice d'antigène.
dATP	: Désoxyadénosine triphosphate.
DISC	: Complexe d'induction de signalisation de mort.
FADD	: Domaine de mort associé à la protéine Fas.
Fccp	: P-trifluorométhoxy-phényl-hydrazone.
GRP 75	: Protéine-75 régulée par le glucose.
GS	: Glutamine-synthétase.
H ₂ O ₂	: Peroxyde d'hydrogène.
HER2	: Récepteur-2 du facteur de croissance épidermique humain.
HSE	: Élément de choc thermique.
HSP	: Protéine du choc thermique.
HSF-1	: Facteur de transcription-1 du choc thermique.
IFN	: Interféron.
IKK	: Inhibiteur de la kinase de I κ B.
I κ B	: Inhibiteur naturel de NF- κ B.
IMM	: Membrane interne mitochondriale.

L•	: Radical lipide libre chargé sur le carbone insaturé.
LOO•	: Lipide peroxydé.
LOOH	: Lipide hydroperoxydé.
MPT	: Transitions de perméabilité mitochondriale.
NF-κB	: Facteur nucléaire κB.
NK	: «Natural killer».
OMM	: Membrane mitochondriale externe.
ORP	: Protéines régulées par l'oxygène.
PBS	: Tampon de phosphate salin.
PCD	: Mort cellulaire programmée.
PI	: Iodure de propidium
PS-1	: Préséniline-1.
PS-2	: Préséniline-2.
PVDF	: Polyvinylidène difluorure.
Rb	: Gène codant pour le rétinoblastome.
RHD	: Domaine d'homologie REL.
ROS	: Espèces réactives oxygénées.
TAD	: Domaine de transactivation.
TNF	: Facteur de nécrose tumorale.
TRAIL	: Substrat apoptotique induisant un facteur de nécrose tumorale.
UCHL-1	: Hydrolase carboxy-terminale L-1.
U.V.	: Ultraviolet.
X•	: Radical libre.
XIAP	: Inhibiteur de protéase de l'apoptose sur le chromosome X.

Résumé

NF- κ B, découvert en 1986 dans des lymphocytes B mature, est un groupe de facteurs de transcription impliqué dans plusieurs processus cellulaires différents tels les réponses immunitaires et inflammatoires, les processus du développement et de la croissance cellulaire ainsi que l'apoptose. L'activité de NF- κ B est régulée par I κ B ; lors de la phosphorylation de ce dernier, NF- κ B est relocalisé vers le noyau. L'apoptose, une mort programmée identifiée en 1972, est caractérisée par une fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques. Les mécanismes contrôlant ce phénomène sont très complexes. Un de ces mécanismes nécessite des protéases à cystéine aspartate-dépendantes que l'on nomme caspases. En utilisant le modèle cellulaire neuronal Neuro 2A, l'objectif de cette étude a été de déterminer si un stress oxydatif (H₂O₂) et un stress thermique (40 à 43°C) pouvaient induire l'apoptose par les mêmes mécanismes et si NF- κ B avait un rôle dans la réponse cellulaire à ces deux stress. Une condensation de la chromatine, une caractéristique de l'apoptose, a été observée lors d'un stress oxydatif comme lors d'un stress thermique dans les Neuro 2A. Bien qu'une diminution de la polarité des membranes mitochondriale n'a été observée que pour le choc thermique, l'activation de l'apoptose serait induite au moins par la voie mitochondriale puisqu'il y a eu activation de la caspase 9 dans les deux stress. L'implication de la voie des récepteurs de mort est moins évidente ; une activité de la caspase 8 est détectée dans les deux stress mais n'est que peu ou pas augmentée par rapport à l'absence de stress. La présence de H₂O₂ (0 à 25 μ M) ne stimule pas l'activité de la caspase 3, mais active significativement l'activité de la caspase 6. Au contraire, durant le choc thermique (42 à 43°C), l'induction de la caspase 3 est très significative, soit environ près de dix fois celle des cellules témoins (37°C), et l'activité de la caspase 6 ne varie pas. La présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 (inhibiteur de la phosphorylation de I κ B, 4 μ M)

a peu d'influence sur l'activité des caspases 3 et 6 lors du stress oxydatif mais multiplie l'activité de la caspase 3 d'environ vingt fois lors d'un stress thermique. En conclusion, nos résultats ont permis de montrer l'implication de la voie mitochondriale (caspase 9) dans la mort apoptotique induite par H_2O_2 et le choc thermique et cela, dans la lignée neuronale Neuro 2A. La caspase effectrice 6 serait activée dans le stress oxydatif mais non thermique. Les résultats pour la caspase 6 dans le choc thermique demeurent à être vérifiés en analysant l'activité de cette caspase plus tardivement. En effet, la caspase 6 est située en aval de la caspase 3 dans les mécanismes apoptotiques. L'utilisation de Bay 11-7082 dans le choc thermique montre que NF- κ B aurait un effet inhibiteur sur l'activation de la caspase 3. Le Bay 11-7082 en combinaison avec le choc thermique pourrait trouver application dans le traitement de tumeurs neuronales.

I- Introduction

1. Mort cellulaire par nécrose et apoptose

1.1 Généralités

La mort cellulaire s'effectue dans l'organisme eucaryote selon plusieurs mécanismes mais principalement par la nécrose et l'apoptose. La nécrose est associée à une mort cellulaire non contrôlée, passive et désordonnée, résultant d'une lésion ou d'un traumatisme, par exemple une coupure, une brûlure ou le contact avec un agent chimique, etc. La cellule engagée dans le processus de nécrose subit un intense gonflement irréversible. Ce gonflement est tel que la cellule va par la suite éclater, libérant ses organites, son ADN ainsi que son contenu enzymatique dans le milieu extracellulaire. Ce largage incontrôlé entraînera un phénomène d'inflammation non désiré par l'organisme dans les tissus et les cellules environnants [1].

Le phénomène de l'apoptose a été décrit pour la première fois par Kerr en 1972 [2]. Depuis, il a été grandement étudié et est maintenant caractérisé comme un mécanisme essentiel au maintien de l'homéostasie et à la survie de l'organisme. Il lui permet d'activer la mort cellulaire ainsi que d'induire le suicide programmé des cellules au moment du développement de l'embryon (exemple, lors de la formation de la cavité oculaire), lorsque des cellules présentent des mutations ou des erreurs de transcription de l'ADN ou bien quand l'ADN est endommagé au-delà de toute réparation possible. Les dommages ou mutations de l'ADN cellulaire peuvent provenir de sources

environnementales telles les rayons U.V., les substances chimiques et toxiques, les infections virales ou bactériennes [3]. Ce sujet sera abordé plus en détail plus tard dans le document au point 5.2.

1.2 Apoptose

L'apoptose est principalement activée selon trois voies de signalisation : des signaux extracellulaires (liaison d'une molécule au récepteur de mort), des signaux mitochondriaux (tel le relâchement de cytochrome C) et la voie du réticulum endoplasmique (cette voie n'a pas été abordée lors de ce projet) (figure 1.1) [3-5].

L'apoptose est caractérisée principalement par un renflement, occasionné par une entrée massive d'eau dans la cellule, suivi d'une condensation du contenu cellulaire et du cytoplasme [4], puis de la condensation et ségrégation de la chromatine [1] se soldant par la dégradation de l'ADN en petits fragments. Cette série d'événements occasionnera la fragmentation de la membrane nucléaire et la formation des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques pourront être phagocytés par les cellules voisines, par les macrophages ainsi que par d'autres cellules présentatrices d'antigènes. Le contenu intracellulaire d'une cellule ayant subi l'apoptose n'entrera jamais en contact avec les autres cellules et donc n'induera pas de phénomène d'inflammation. Le système de contrôle entre la survie cellulaire et l'apoptose est un équilibre entre la synthèse, l'activation ou l'inactivation de protéines pro- et anti-apoptotiques. On distingue des protéines telles que Bak, Bad et Bax dans la catégorie des pro-apoptotiques, ainsi que Bcl-2 et Bcl-x_L dans la catégorie des anti-apoptotiques [4].

1.2.1 Structure et fonction des caspases

Le mécanisme par lequel l'apoptose est induite à l'intérieur des cellules diffère selon qu'il provient d'un signal extracellulaire ou d'un signal influençant la balance électrochimique des membranes de la mitochondrie. Cependant, peu importe qu'il s'agisse de la voie des récepteurs de mort ou de la voie mitochondriale, le mécanisme nécessite, la plupart du temps, l'intervention des protéases à cystéine aspartate-dépendantes que l'on nomme caspases et qui sont présente dans la presque totalité des cellules de mammifères [5, 6]. Il n'existe pas moins de quatorze caspases différentes, habituellement sous forme inactive (zymogène), situées dans le cytoplasme et dans la mitochondrie [5, 6, 7, 8]. On peut les diviser en quatre catégories selon leurs fonctions [6, 7] :

- ❖ les caspases initiatrices de l'apoptose (caspases 2, 8, 9, 10, 12)
- ❖ les caspases effectrices de l'apoptose (caspases 3, 6, 7)
- ❖ les caspases activatrices des cytokines contrôlant les mécanismes inflammatoires (caspases 1, 4, 5, 11, 13)
- ❖ les autres fonctions (caspase 14).

Les caspases partagent toutes quelques homologies au niveau de leurs séquences d'acides aminés, de leurs structures tertiaires ainsi que leurs spécificités aux substrats. Elles sont toutes synthétisées sous forme de zymogène contenant une chaîne simple d'environ 30 à 50 kDa. Cette chaîne contient trois domaines communs à toutes les caspases :

- un domaine terminal NH₂
- une large sous-unité d'environ 20 kDa
- une petite sous-unité effectrice d'environ 10 kDa [5].

Dépendamment du type de stress apoptotique, il y a activation d'une ou plusieurs des voies de signalisation qui entraînent l'activation de caspases initiateuses par clivage protéolytique. Celles-ci pourront être sollicitées à leur tour pour activer d'autres caspases dont les caspases effectrices de l'apoptose [3, 6, 7]. Les caspases effectrices se classent en quatre catégories selon les cibles touchées [5] :

1. Protéines agissant sur l'arrêt du cycle cellulaire
2. Protéines permettant l'inactivation du système de réparation de l'ADN
3. Inhibiteurs protéiques naturels de l'apoptose (XIAP, IAP-1, IAP-2, survivine)
4. Protéines du cytosquelette

1.2.2 Voie mitochondriale

Dans le cas de la voie de signalisation mitochondriale, un déséquilibre s'effectue entre les protéines pro- et anti-apoptotiques situées sur les membranes des mitochondries, ces protéines étant chargées, elles créent un déséquilibre électrostatique entre les membranes mitochondriales interne (IMM) et externe (OMM) [5, 9]. La dépolarisation résultante favorise la création de pores intermembranaires permettant un relâchement de cytochrome C au niveau du cytoplasme (*figure 1.1*). Le cytochrome C, le facteur d'activation de la voie de signalisation de l'apoptose (Apaf-1), la désoxyadénosine triphosphate (dATP) et la pro-caspase 9 forment un complexe heptahédrique appelé apoptosome [5]. La formation de l'apoptosome permet l'autoclivage de la pro-caspase 9 en caspase 9 activée [3]. La pro-caspase 9 possède un domaine d'association et de recrutement de caspases (CARD) à son extrémité NH₂, permettant l'association de la pro-caspase 9 avec Apaf-1 et le cytochrome C. Grâce au domaine CARD, la caspase 9 peut par la suite recruter et cliver d'autres pro-caspases comme les pro-caspases 3, 6 et 7 [5]. L'activation de la pro-caspase 3 en caspase 3, permet l'activation d'autres caspases effectrices telles la 6 et la 7, et/ou active le processus de condensation de la chromatine et la formation des corps apoptotiques [10].

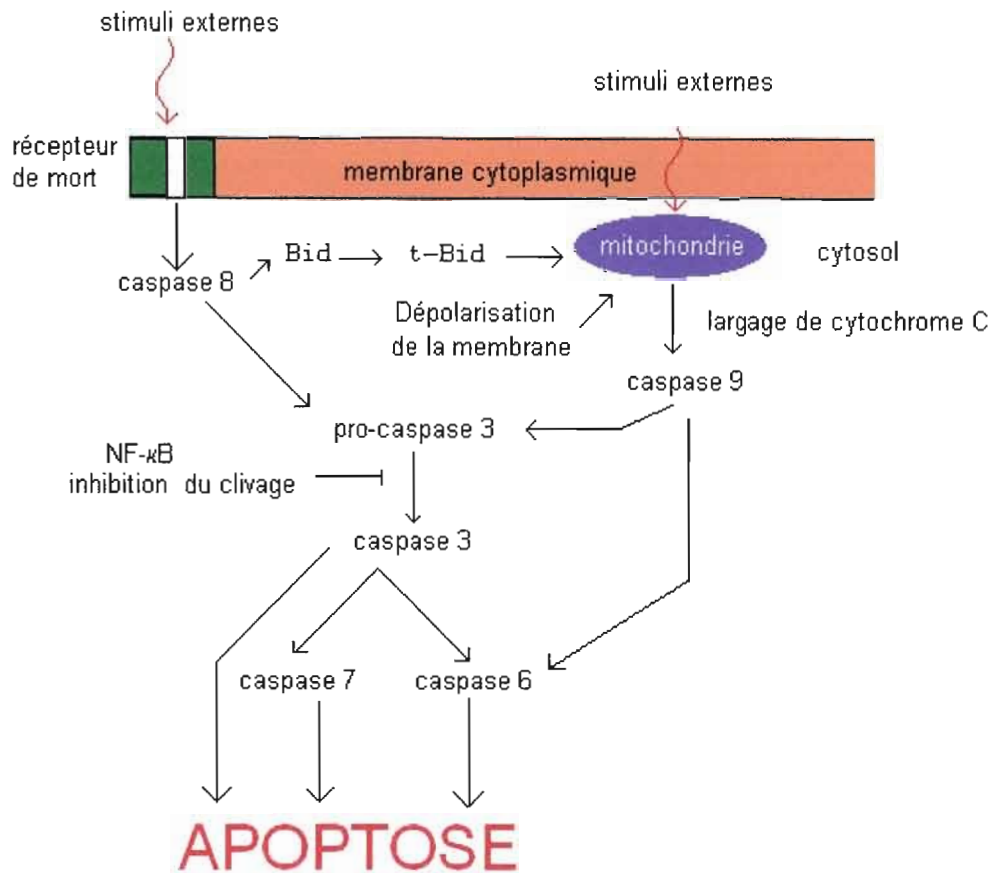


Figure 1. 1 Voies apoptotiques médiées par les caspases.

1.2.2.1 Le cytochrome C

Le cytochrome C est une protéine de 13 kDa provenant d'un gène nucléaire et traduit par un ribozyme cytosolique en apocytochrome C [5]. Suite à sa synthèse, l'apocytochrome C est transloqué du cytoplasme vers la mitochondrie. Une fois à l'intérieur de celle-ci, l'apocytochrome C lie par lien covalent un groupement Hème pour former un complexe appelé holocytochrome C. La liaison entre l'apocytochrome C (sans le Hème) et l'Apaf-1 est possible et prévient la formation de l'apoptosome entraînant l'inhibition de l'apoptose. L'absence d'holocytochrome C,

résultant d'une inhibition de synthèse ou de translocation cytoplasmique, entraîne l'inhibition de l'apoptose d'origine mitochondriale. En effet, l'holocytochrome C est essentiel à la formation de l'apoptosome, puisqu'il permet la liaison entre Apaf-1 et la pro-caspase 9 [5]. Deux facteurs influencent principalement le largage du cytochrome C : les protéines membres de la famille Bcl-2 ainsi que les transitions de perméabilité mitochondriale (MPT) [5].

1.2.2.1.1 Perméabilité membranaire de la mitochondrie selon la famille Bcl-2

La perméabilité des membranes de la mitochondrie est régulée par un grand nombre de protéines regroupées sous la famille Bcl-2. Il est possible de diviser les membres de cette famille en deux sous-groupes comprenant les pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bcl-xs, Bid) et les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl1) [5]. Parmi les protéines anti-apoptotiques, on retrouve Bcl-2 et Bcl-xl, principalement localisées sur la membrane extérieure de la mitochondrie [5]. Une surexpression des ces protéines suite à un stress oxydatif ou à un choc thermique peut inhiber la perméabilité des membranes de la mitochondrie et empêcher le relâchement de cytochrome C [11]. Cet effet a été étudié dans de nombreux types cellulaires [11].

Lors de l'induction de l'apoptose, la protéine Bax, membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, subit un changement de conformation permettant sa translocation du cytosol vers la mitochondrie. Une fois à la mitochondrie, Bax est capable de s'insérer dans l'espace intermembranaire mitochondrial et permet la formation de pores et le largage du cytochrome C vers le cytosol [5].

1.2.2.1.2 Les transitions de perméabilité mitochondriale (MPT)

Les MPT ont eux aussi une influence sur le largage du cytochrome C. Elles résultent de l'ouverture de canaux entre l'IMM et l'OMM. L'ouverture de tels canaux est nécessaire pour permettre l'introduction ou la sortie de protéines et autres molécules de la mitochondrie. L'ouverture d'un canal pourrait permettre la sortie de cytochrome C. Cependant, en l'absence de caspases effectrices activées, cette sortie de cytochrome C est incapable d'induire l'apoptose dans les cellules. Une inhibition des MPT peut prévenir les dysfonctionnements mitochondriaux, le relâchement de cytochrome C ainsi que l'apoptose associée à la voie mitochondriale [5].

1.2.3 Voie des récepteurs de mort

Des molécules extracellulaires, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), peuvent agir en se liant avec le récepteur de mort (TNRF) sur la membrane plasmique (*figure 1.1*). Cette liaison entraîne la trimérisation du récepteur pour former un complexe d'induction de signalisation de mort (DISC). Le complexe DISC est constitué de la protéine FADD (associée à un domaine de mort (TNFADD)), du récepteur et de la pro-caspase 8 [5]. Il permet l'activation de la pro-caspase 8 en caspase 8 active. Une fois la caspase 8 active, elle peut, grâce au domaine CARD, recruter et ensuite activer la pro-caspase 3 en caspase 3, qui à son tour peut activer d'autres caspases effectrices telles les caspases 6 et 7 ou tout simplement démarrer le processus de condensation de la chromatine et de formation des corps apoptotiques.

1.2.4 Voie de t-Bid

Une autre voie de signalisation est possible suite à l'activation de la caspase 8 ainsi que la caspase 10. Cette voie est activée suite au clivage par la caspase 8 d'une protéine cytoplasmique nommée Bid [5]. La protéine Bid est clivée en son fragment actif t-Bid, qui subit une translocation vers la mitochondrie. Cette translocation provoque l'activation de la protéine Bax, qui initie à son tour le dysfonctionnement de la mitochondrie ainsi qu'un largage de cytochrome C. Il est donc possible suite à un stimulus activant la voie des récepteurs de mort d'entraîner l'activation de la voie mitochondriale, ce qui a pour effet d'accentuer le processus d'apoptose [5].

2. Facteur Nucléaire- κ B (NF- κ B)

2.1 Généralités

Le NF- κ B a été identifié en 1986 dans les lymphocytes B matures [10]. Il a été décrit comme jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes impliqués lors de la synthèse des chaînes κ légères pour la reconnaissance des antigènes [12]. Grâce à de nombreuses études, il a été découvert que NF- κ B est, non pas une seule et unique protéine, mais bien une famille de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires divers tels les réponses immunitaires, les réponses inflammatoires, les processus de développement embryonnaire ainsi que durant l'induction de l'apoptose [10, 13].

Les facteurs de transcription de la famille de NF- κ B possèdent tous une même caractéristique, soit une partie NH₂-terminale contenant un domaine d'homologie REL (RHD) d'environ 300 acides aminés. Cette séquence permet une liaison spécifique à l'ADN, la formation d'un dimère entre facteurs NF- κ B et aussi l'interaction moléculaire entre NF- κ B et son inhibiteur naturel I κ B.

2.1.1 Les constituants de NF- κ B

NF- κ B est codé par cinq gènes : NF- κ B1, NF- κ B2, c-Rel, RelA et RelB [14, 15]. Ces gènes sont responsables de la synthèse de sept protéines, soit p105, p100,

p52, p50, c-Rel, RelA et RelB [15]. La protéine p50 est constituée uniquement de l'extrémité NH₂ de p105 (délétion de la portion carboxyle terminale). Il en est de même pour la protéine p52 qui ne contient que la partie NH₂ de p100 [14]. Seules les protéines c-Rel, RelA et RelB possèdent la partie carboxyle contenant le domaine de transactivation (TAD) permettant l'interaction de NF- κ B avec des protéines impliquées dans la transcription (eg. Facteur de transcription) [14]. Les protéines de la famille de NF- κ B existent sous forme d'hétéro ou homodimères au niveau du cytoplasme (tableau 1.1).

Tableau 1. 1: Liste des dimères de NF- κ B possibles et de leurs gènes cibles

Protéines	Dimérisation possible	Gènes ciblés
RelA	RELA-RELA	IL8, collagène de type VII, ICAM1
	RELA-p50	I κ B α , IL8, IL6, TNF α , GM-CSF, HIV1
	RELA-c-REL	uPA, IL2R α , MCP1
RelB	RELB-p50	MDC
	RELB-p52	SLC, ELC, MDC
c-Rel	c-REL-c-REL	IL8
	c-REL-p50	IL12/p40, IL12/p35, IL2R α
p50	p50-p50	TNF α , IL6, CHM-II
	p50-BCL3	BCL2
p52	p52-p52	CMH-II
	p52-BCL3	Cycline D1, BCL2

Tiré de Chen et Greene [14]

2.2 Régulation de NF- κ B par I κ B

NF- κ B se retrouve principalement dans le cytoplasme cellulaire. La régulation de son activité est contrôlée par la famille des protéines I κ B, qui sont des inhibiteurs naturels de NF- κ B. I κ B permet l'inhibition de la translocation nucléaire en masquant la séquence de NF- κ B de relocalisation nucléaire. La famille I κ B est constituée des protéines suivantes : I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , et BCL3 [14]. L'inhibition de l'interaction entre I κ B et NF- κ B est régie par la phosphorylation de I κ B par un complexe appelé IKK (I κ B-kinase). Il existe deux familles de IKK : IKK1 qui est rapidement inductible et IKK2 qui possède un niveau d'induction plus lent [14]. Le complexe IKK est constitué de deux kinases très homologues, IKK α et IKK β , et d'une partie régulatrice non-enzymatique impliquant entre autres I κ B γ (I κ B γ : inhibiteur de la kinase de κ B gamma) [15]. La phosphorylation de I κ B par IKK occasionne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome [10-14, 16, 17]. Cette dégradation libère NF- κ B et expose sa séquence de relocalisation nucléaire. Cette séquence permet la translocation de celui-ci du cytoplasme vers le noyau de la cellule [13, 17] (*figure 1.2*). Une fois que le complexe NF- κ B se trouve dans le noyau, il se lie à l'ADN grâce à sa séquence TAD et active la transcription de gènes (cytokines, gènes anti-apoptotiques et autres) [10, 17, 18]. Sa présence dans le noyau entraîne aussi l'activation de la synthèse des ARNm codant pour les I κ B par un phénomène de rétro-inhibition. L'inhibiteur I κ B se rend alors dans le noyau pour se lier au dimère de NF- κ B et ainsi inhiber son activité.

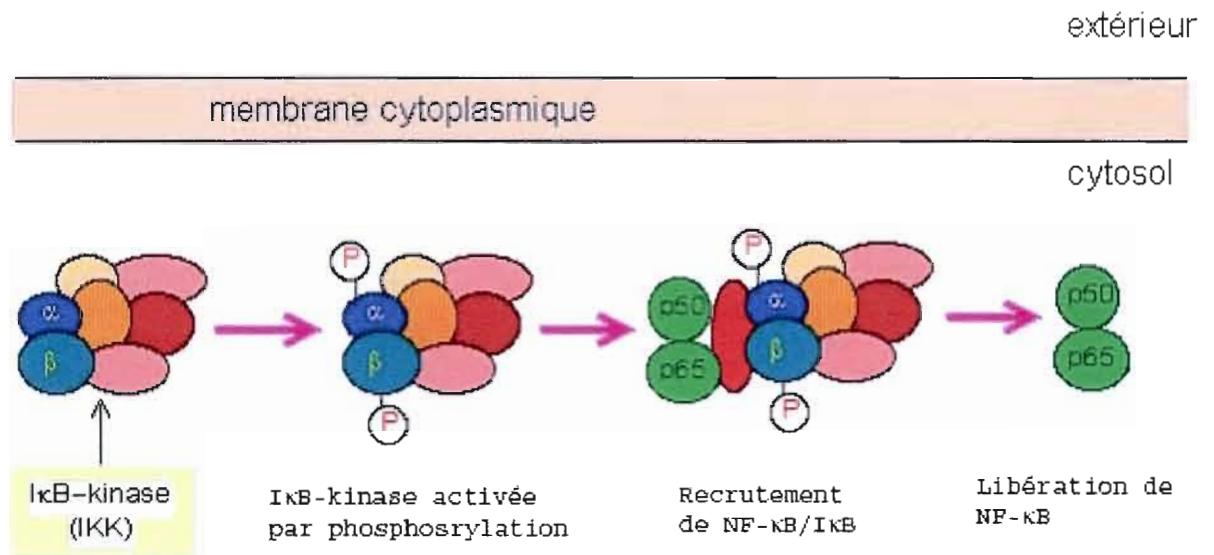


Figure 1. 2: Mécanisme d'activation du dimère de NF-κB.

Le complexe kinasique IKK (comprenant entre autres IKK α et IKK β) est responsable de la phosphorylation de IκB. Lorsque ce complexe est phosphorylé, il permet le recrutement du complexe NFκB (vert)/IκB (rouge), puis la phosphorylation de IκB et la libération de NFκB qui s'en va au noyau.

(Référence : www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6F2.htm)

2.3 Voies d'activation de NF- κ B

Il existe deux voies de signalisation de l'activation de NF- κ B (*figure 1.3*) [15, 19], soit la voie classique lors d'infection ou d'inflammation ou la voie alternative par cytokines tel le TNF. Ces deux voies de signalisation seraient responsables de l'inhibition de l'apoptose [15] (*figure 1.3*).

2.3.1 Voie classique de NF- κ B

La voie classique est activée en réponse à une infection virale, bactérienne ou suite à un stress inflammatoire entraîné par la présence de cytokines pro-inflammatoires et lors de nécroses massives. Il y a une activation du complexe IKK2 entraînant la phosphorylation et la dégradation de I κ B. Cette voie vise principalement à activer les dimères p50/RelA et p50/c-Rel (*figure 1.3*) ce qui a pour effet de favoriser le recrutement des cellules présentatrices d'antigène (CPA) comme les macrophages et les monocytes vers le site de l'inflammation.

2.3.2 Voie alternative de NF- κ B

La voie de signalisation alternative est activée par des cytokines particulières dont certaines sont des membres de la famille TNF. Elle est caractérisée par l'activation spécifique des dimères p100/RelB que l'on retrouve dans le cytoplasme [15].

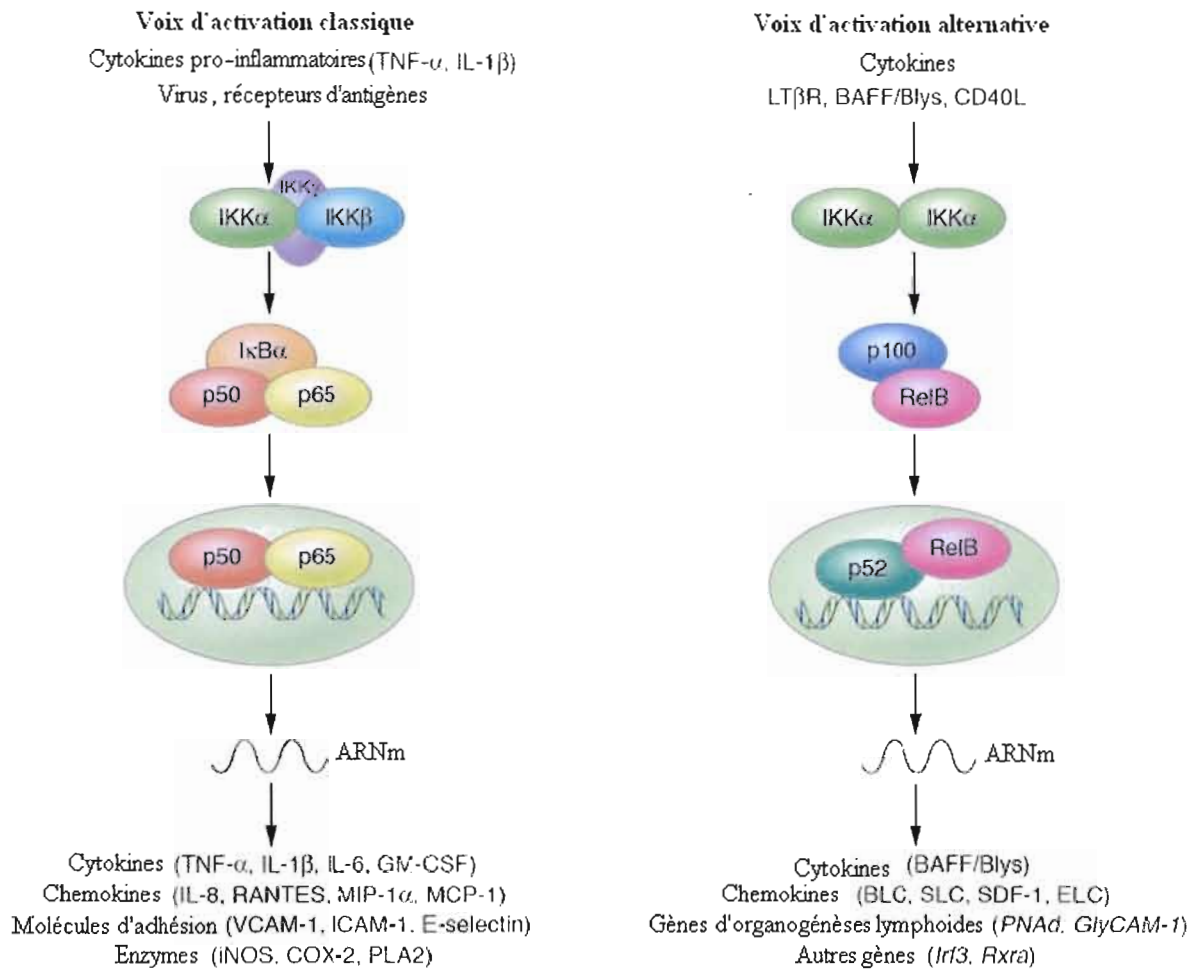


Figure 1. 3: La voie d'activation de IKK/NF- κ B dépend du stress initiateur.

Suite à cette activation, certains dimères de NF- κ B seront principalement activés ce qui résultera en l'activation de diverses cytokines et chimiokines.

(Adapté de :Luo J.et al. ,2005 [15])

2.4 Les effets de NF- κ B lors de l'induction de l'apoptose

Comme vu précédemment, il existe divers facteurs pouvant empêcher l'apoptose. Ils ont la capacité d'inhiber l'activation des voies de signalisation, d'inhiber le clivage d'une pro-caspase en caspase active ou tout simplement de promouvoir la survie cellulaire comme dans le cas de NF- κ B (figure 1.4).

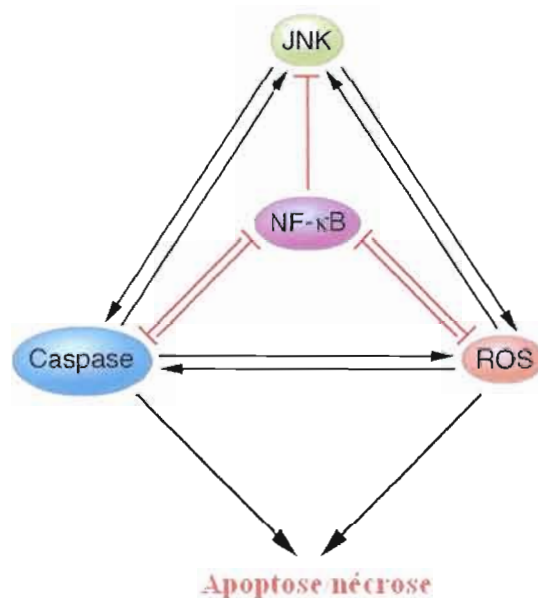


Figure 1. 4: Relation entre l'activation des caspases, l'induction de l'apoptose, la présence de radicaux libres ainsi que l'inhibition qu'exerce NF- κ B sur ces systèmes

Adapté de :Luo J.et al. (2005) [15]

En effet, NF- κ B stimule la synthèse de plusieurs protéines anti-apoptotique (e.g. FLIP, Bcl-X_L et c-IAP), et peut inhiber le recrutement (caspase 8) ou l'activation protéolytique (caspase 3) de caspases [13, 15, 19]. Il agit en inhibant la perméabilisation et la dépolarisation de la membrane mitochondriale, entraînant par ce fait même l'inhibition du relâchement du cytochrome C. L'inhibition de NF- κ B (soit par un inhibiteur naturel tel le curcumin ou chimique tel que le Bay 11-7082,

lequel inhibe la phosphorylation d'I κ B) aurait comme effet d'augmenter la production d'IAP ce qui favoriserait le relâchement de cytochrome C dans le cytosol et induirait ainsi une augmentation de l'activation de la pro-caspase 9 et des autres caspases effectrices [19].

Certaines études ont rapporté une activité pro-apoptotique à NF- κ B [15, 20, 21]. Son rôle dans l'induction de l'apoptose n'est pas encore très clair, mais il a été démontré que NF- κ B était responsable d'une certaine induction de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome de type N [20], et que son activité pro-apoptotique est essentielle lors de la maturation de certaines populations de thymocytes [21]. Sous certains stimuli atypiques, NF- κ B deviendrait pro-apoptotique en jouant un rôle afin d'inhiber des gènes anti-apoptotiques. Bien que cet effet n'a pas encore été démontré *in vivo*, NF- κ B (dimère de RelA) s'associerait avec l'histone-désacétylase, ce qui entraînerait une diminution de l'expression de certaines protéines pro-apoptotiques inconnues [15].

Des recherches ont démontré une augmentation de la présence et du taux d'activation du complexe NF- κ B dans le noyau de cellules neuronales lors de la maladie d'Alzheimer [10, 17, 22]. Cette suractivité de NF- κ B pourrait expliquer le haut taux de pertes neuronales si celui-ci s'avérait posséder une activité pro-apoptotique lors de la maladie.

3. Maladie d'Alzheimer

3.1 Généralités

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois en 1907 par le Dr Alois Alzheimer [23]. C'est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui affecte les populations âgées. Des études épidémiologiques ont évalué que cette démence affecte plus de quatre millions de personnes aux États-Unis seulement [24]. On la caractérisait au début comme une étrange maladie qui affectait particulièrement le cortex cérébral, dans lequel se retrouvaient d'étranges altérations au niveau du réseau neuronal. Après plus de quatre-vingt-dix ans d'études, les caractéristiques particulières de cette maladie ont finalement été définies [23, 24]. Elle est caractérisée par une perte de synapses, par la présence de plaques séniles principalement constituées des protéines β -amyloïdes, par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires constitués majoritairement de dépôts de fragments 39-43 du peptide amyloïde [24], par des neurofibrines et d'agrégats de protéines oxydées et partiellement dénaturées, et aussi par la présence de sites d'inflammation entourant ces plaques.

3.1.1 Évolution de la maladie

Bien que le diagnostic final de la maladie ne s'effectue que post-mortem [25], il est maintenant possible grâce au séquençage [26] et à des test psychologiques d'établir avec beaucoup de certitude la présence de la maladie et de suivre son développement. L'évolution de cette maladie peut être scindée en trois phases :

- *Phase initiale* : Pertes de mémoire épisodiques, la mémoire à court terme restant intouchée durant cette phase [23].
- *Phase intermédiaire* : début du changement de la personnalité du patient, perte de notion du temps, période durant laquelle la personne peut être très confuse et perte de mémoire du passé [23].
- *Phase avancée* : la personne n'est plus en mesure d'avoir des contacts avec son entourage, perte graduelle de la maîtrise de la vessie et des intestins [23].

3.2 Forme familiale et sporadique

Les causes génétiques de la maladie d'Alzheimer n'ont pas encore été identifiées sauf en ce qui concerne certaines formes familiales. Ces formes d'Alzheimer représentent environ 15% des cas et seraient attribuables à une mutation transmissible de gènes situés sur le chromosome 21 tels ceux de la préséniline-1 (PS-1), la préséniline-2 (PS-2), le précurseur de la protéine amyloïde (APP- β) et la protéine Tau [23, 26, 27, 28]. Les principaux facteurs de risque pour les formes

sporadiques seraient l'âge et la présence du génotype E₄ de l'apolipoprotéine (ApoE₄) [26, 29]. Les recherches évoluant depuis plusieurs années, les chercheurs ont réussi à démontrer que 40 à 80% des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer possédaient l'allèle du gène de l'ApoE₄ [30]. L'ApoE₄ a aussi été reconnue comme un facteur influençant l'apparition prématurée de la maladie. Cette protéine joue aussi un rôle important sur la vitesse de progression et la sévérité de la maladie [26, 31-37]. Ce même gène a été identifié dans d'autres maladies telles que la maladie de Parkinson, la sclérose en plaque et le diabète neuropathique comme étant un facteur très influent de leur développement [38-42].

À travers sa vie et surtout avec l'âge, l'être humain doit être en mesure de maintenir les connexions synapto-dendritiques essentielles au fonctionnement du cerveau, ainsi qu'être en mesure d'effectuer des remodelages et des réparations du réseau neuronal [43, 44]. L'apolipoprotéine E est essentielle à ce remodelage et à la réparation neuronale puisqu'elle agit sur les fonctions de transport des lipides. Il existe trois isoformes de l'apolipoprotéine, soient E₂, E₃ et E₄. Les isoformes E₂ et E₃ sont efficaces pour le maintien et la réparation neuronale [44-47], cependant l'isoforme E₄ l'est beaucoup moins [43]. La seule présence de l'isoforme E₄ induit des stress aux cellules comme le stress oxydatif, la surproduction de APP-β et l'inflammation (*figure 1.5*) [43,44].

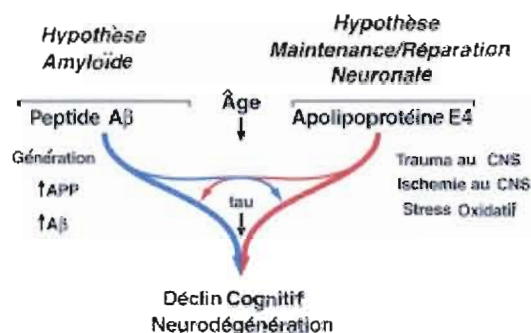


Figure 1. 5: Facteurs pouvant stimuler la synthèse de l'Apo-E₄ et du peptide Aβ.

L'Apo-E₄ et le peptide Aβ peuvent seuls ou en synergie, entraîner un déclin cognitif dû à une neurodégénération.

(Adapté de Mahley R., et al., 2006 [43])

3.3 Maladie d'Alzheimer et apoptose

La mort cellulaire par apoptose a été impliquée *in vitro* dans la maladie d'Alzheimer, mais il n'a pas encore été clairement démontré *in vivo* que cette dégénérescence s'effectuerait par les mécanismes de l'apoptose [48-51]. Cependant certaines études *in vivo* ont réussi à démontrer que lors de la maladie d'Alzheimer, il y avait accumulation intracellulaire du peptide Aβ. Cette accumulation exercerait une pression neurotoxique sur les mitochondries qui entraînerait leur gonflement et un relâchement du cytochrome C dans le cytosol. Le cytochrome C cytosolique va activer la pro-caspase 3 conduisant à l'apoptose neuronale ainsi qu'à une neurodégénérescence [52, 53]. De plus, la présence de plaques β-amyloïdes, *in vivo*, induit, chez des souris transgéniques, une modification de l'homéostasie cellulaire au niveau de la régulation du Ca²⁺ intracellulaire. Ce dérèglement entraîne l'activation des calpaines, un dysfonctionnement de la mitochondrie, l'activation des caspases et l'activation de la mort cellulaire par apoptose [44, 54, 55].

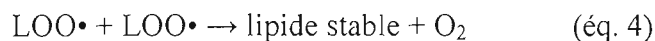
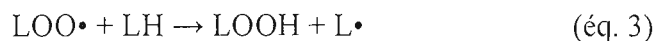
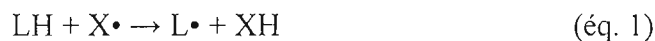
3.4 La maladie d'Alzheimer et stress oxydatif

Les dépôts β -amyloïdes, constituants principaux des plaques séniles, sont la cause majeure de la dégénérescence et de la mort neuronales par des mécanismes impliquant des radicaux oxygénés libres (ROS) [56]. Une augmentation de la présence de protéines et de lipides oxydés a en effet été identifiée par des méthodes histochimiques à l'intérieur des enchevêtrements neurofibrillaires et des plaques séniles chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [56, 57]. Cette oxydation peut modifier la structure des protéines, telles la β -actine et les créatine-kinases, résultant en une perte de l'activité enzymatique diminuant ainsi le métabolisme neuronal [58].

Des coupes de cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer ont montré une diminution des acides gras polyinsaturés qui sont normalement abondants dans cet organe, une augmentation de 4-hydroxy-2-trans-nonéanal (HNE, un aldéhyde toxique) et d'acides gras polyinsaturés oxydés (neurotoxiques) ainsi qu'une baisse de la fluidité des membranes cytoplasmiques [44,56]. La dégénérescence neuronale observée lors de la maladie d'Alzheimer pourrait probablement être induite par un stress oxydatif [59] occasionné par des produits de métabolisme interne tels le peroxyde d'hydrogène et/ou des aldéhydes (produits d'oxydation des lipides). Ces produits continueraient à alimenter la peroxydation des lipides et de protéines, favorisant une augmentation de la concentration des radicaux libres au niveau du cerveau du patient atteint.

3.4.1 Oxydation lipidique

Les lipides sont très vulnérables au stress oxydatif dû à la présence de chaînes β -polyinsaturées. La peroxydation des lipides est initiée par la présence d'un radical libre ($X\bullet$) qui entraîne la perte d'un hydrogène sur un carbone insaturé (éq. 1) ce qui résulte par la formation de lipide radical libre chargé sur le carbone insaturé ($L\bullet$). Ce carbone va réagir rapidement avec une molécule d'oxygène O_2 pour former un lipide peroxydé ($LOO\bullet$) (éq. 2). Ce lipide peroxydé peut par la suite réagir avec un lipide environnant pour former un lipide hydroperoxydé ($LOOH$) ainsi qu'un nouveau lipide radical libre chargé sur le carbone insaturé ($L\bullet$) (éq. 3). Cette réaction contribue à maintenir un taux fixe de $L\bullet$ pour perpétuer le cycle d'oxydation des lipides. Ce cycle se poursuit jusqu'au moment où deux lipides peroxydés réagissent ensemble, ce qui entraîne la neutralisation de leur charge et le radical libre donnant naissance à une production d'oxygène (éq. 4) [24]. Cette suite d'événements peut occasionner des dégâts importants pouvant possiblement mener au déclenchement de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'induire d'autres processus tel une inflammation localisée.



3.4.2 Oxydation protéique

Suite au développement de techniques de protéomique, la recherche est maintenant capable d'identifier les principales protéines oxydées lors de la maladie d'Alzheimer à l'aide de coupes de cerveaux autopsiés [27, 60]. Les principales protéines oxydées dans la maladie d'Alzheimer sont : les créatine-kinases (CK), qui sont des catalyseurs de phosphorylation, la glutamine-synthétase (GS), qui sert lors de la synthèse de bases azotées, et l'hydrolase carboxy-terminale L-1 (UCHL-1), impliquée dans le processus d'ubiquitination des protéines [57]. Il a été également démontré qu'un dérèglement du système ubiquitine-protéasome favoriserait l'accumulation et l'agrégation des protéines oxydées [57, 61, 62].

4. Choc thermique et mécanisme de survie cellulaire

4.1 Généralités

Les cellules eucaryotes font constamment face à diverses conditions environnementales qui peuvent induire des stress chroniques ou aigus. Pour s'adapter aux changements de leur environnement et à diverses blessures, les cellules ont développé à travers l'évolution plusieurs mécanismes de détection et de contrôle. La thermotolérance est l'un des systèmes de protection et de survie cellulaire qui attire le plus d'attention puisqu'il est nécessaire à la survie cellulaire dans une variété de conditions toxiques.

Dans les cellules de la plupart des eucaryotes, les protéines du choc thermique (HSP) ne sont pas seulement synthétisées lors de l'hyperthermie, mais aussi suite à une altération intracellulaire des mécanismes d'oxydoréduction, à une exposition à des métaux lourds, des médicaments cytotoxiques, des polluants[63]. L'exposition prolongée à ces stress pourrait entraîner l'apoptose. Cependant, l'induction de la synthèse des HSP permet aux cellules d'acquérir une cytoprotection contre les dommages moléculaires et de mieux tolérer ces stress [63, 64]. L'activation de la synthèse des HSP dans les cellules animales requiert la translocation nucléaire d'un ou plusieurs facteurs de transcription spécifiques à l'induction de la cytoprotection par les HSP.

4.2 Phénomène de thermotolérance

Suite à un choc thermique, un nombre anormalement élevé de protéines est partiellement dénaturé en même temps. Cette dénaturation favorise une agrégation protéique désastreuse pour la cellule. Heureusement, la dénaturation et l'agrégation des protéines sont des facteurs puissants qui stimulent la synthèse des HSP en abondance. L'activation du facteur de transcription-1 du choc thermique (HSF-1) stimule, à plusieurs niveaux, une synthèse massive des HSP. HSF-1 permet une stabilisation accrue des ARNm des HSP, facilite la transcription des HSP et stabilise les HSP au niveau protéique [11]. Suite leur synthèse, les HSP se lient aux protéines dénaturées et servent de chaperonnes. Cette liaison octroie à la cellule une cytoprotection face au stress [64]. Certaines HSP, telles HSP27, HSP70 et HSP90, ont un rôle de soutien et de stabilisation des protéines partiellement dénaturées. La fonction stabilisatrice des HSP permet aussi à d'autres chaperonnes de replier correctement les protéines [11]. L'agrégation de protéines dénaturées est un fort inducteur de mort cellulaire programmée (PCD, soit par apoptose ou nécrose). Cependant, la présence des HSP, aussi impliquées dans l'inhibition de l'apoptose par plusieurs mécanismes différents, donne un laps de temps appréciable aux cellules leur permettant de réparer les protéines endommagées ou de les dégrader grâce au protéasome, d'où leur rôle dans la survie cellulaire [11].

4.3 Les constituants de la famille des HSP

Le groupe des protéines HSP est constitué principalement des suivantes : l'ubiquitine, les HSP10, HSP27, HSP32, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 et HSP100 [11, 63]. Leurs appellations sont basées sur leur poids moléculaire. Les HSP sont divisées en deux sous-groupes : les protéines de soutien (stabilisation moléculaire) et les protéines de pliage (*tableau 1.2*). Dans le sous-groupe de soutien, on retrouve essentiellement la classe des HSP70 et 90 et dans celui de pliage il est possible d'identifier les HSP 60 et autres chaperonines.

Tableau 1. 2 : Résumé des principaux groupes des HSP, de leurs fonctions intracellulaires et de leurs co-facteurs

Protéines	Fonction	Co-chaperonnes
HSP27	Pliage	aucune
HSP60	Pliage	HSP10
HSP70	Stabilisation	HSP40, GrpE, BAG, HSPBP1, Hip, Hop, CHIP
HSP90	Stabilisation	p23, Hop, FKBP51, FKBP52, Cyp40, cdc37
HSP110	Stabilisation	aucune

Tiré de Calderwood S. (2006). [63]

4.3.1 Les HSP70

Le sous-groupe des HSP70 est constitué de protéines ayant un poids d'environ 70 kDa. C'est l'un des sous-groupes des HSP le plus étudié. On y reconnaît les protéines suivantes : HSP70, HSC70, HSP72 et la protéine-75 reliée au glucose (GRP

75). Elles possèdent un très haut taux de synthèse et sont surtout localisées dans le cytosol ainsi qu'au niveau du noyau et du réticulum endoplasmique [63]. L'activation des HSP70 survient suite à la dénaturation protéique.

Les HSP70 sont formées de trois domaines :

- Un domaine C-terminal de 10 kDa, contenant le site de liaison au substrat
- Un domaine intermédiaire de 18 kDa, reliant les domaines C-terminal et N-terminal
- Un domaine N-terminal de 44 kDa, contenant un site de liaison de l'adénosine triphosphate (ATP)

La dénaturation protéique est un des facteurs requis pour induire les facteurs d'activation des HSP. Cette activation permet la phosphorylation des HSF, puis la dissociation des complexes HSF-HSP. Une fois libérées des HSP, les HSF se trimérisent et sont transloquées dans le noyau. Dans le noyau, les trimères se lient aux promoteurs de différents gènes à des sites appelés éléments de choc thermique (HSE). Cette liaison active la synthèse de diverses HSP [63]. Lors d'un choc thermique, la néo-synthèse des HSP70 est telle que celles-ci deviennent les protéines les plus abondantes de la cellule. Une fois synthétisées, les HSP70 se lient de façon ATP-dépendante aux protéines dénaturées avec une préférence pour des régions hydrophobes exposées lors de la dénaturation [11]. Elles possèdent un rôle de chaperonnes en stabilisant la conformation des protéines. De plus, les HSP70 sont responsables de la régulation des mouvements des récepteurs dans les membranes et des activités enzymatiques de certaines protéines [63].

Les HSP70 sont aussi exprimées de façon constitutive. Elles possèdent alors une fonction de stabilisation de l'ARNm nouvellement transcrit. Les HSP70 sont

capables de se lier à la chaîne polypeptidique en élongation. Cette liaison empêche le repliement trop hâtif de la protéine sur elle-même [11]. Une fois leur fonction accomplie, les HSP70 se séparent de la protéine suite à leur activité ATPase intrinsèque. Les HSP70 jouent un rôle de protection cellulaire contre la PCD en interagissant avec plusieurs protéines-clés telles que c-JunK et en empêchant le largage de cytochrome C par la mitochondrie (figure 1.6) [11].

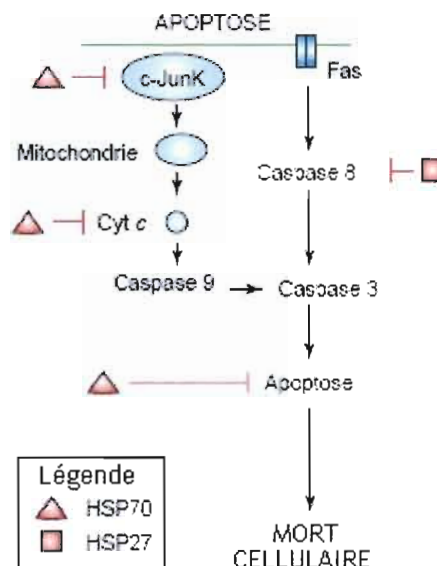


Figure 1. 6: Les HSP27, HSP70 et l'apoptose

(Adapté de : Calderwood S. et al. 2006 [63])

Diverses HSP peuvent inhiber l'activation de l'apoptose selon les voies des récepteurs de mort ou la voie mitochondriale. Les HSP70 peuvent empêcher l'activation de c-JunK, la formation de l'apoptosome par le cytochrome C et les étapes tardives de l'apoptose. Les HSP27 peuvent inhiber le clivage de la pro-caspase 8 en caspase 8 active.

4.3.2 Les HSP90

Le sous-groupe des HSP90 est très important pour la survie cellulaire. En effet, on retrouve jusqu'à 40% d'homologie séquentielle entre les HSP90 de procaryotes et d'eucaryotes [63]. Elles sont constituées de deux domaines chargés. Les HSP90 possèdent des fonctions semblables à celles des HSP70. Elles interviennent comme chaperonnes lors de la traduction des ARNm en stabilisant et en empêchant un repliement hâtif des protéines [63]. Lors d'un choc thermique, les HSP90 se lient aux séquences hydrophobes des protéines partiellement dénaturées. En ce qui a trait à leur expression constitutive, les HSP90 sont nécessaires à l'activité et à la stabilité de près d'une centaine de protéines diverses essentielles au métabolisme cellulaire. Elles agissent encore une fois comme chaperonnes en se liant à des protéines ayant une structure tertiaire instable ou bien en facilitant le transport de molécules entre le cytoplasme et le noyau [11]. Le largage des protéines «stabilisées» est lié à l'activité ATPase des HSP90.

Les HSP90 ont une fonction très importante dans la régulation de la mitose ainsi que dans le cycle de croissance cellulaire. En effet, elles jouent un rôle dans la stabilisation de la structure très fragile de nombreux récepteurs membranaires, de protéines-kinases et de facteurs de transcription qui se lient à l'ADN tout au long du cycle cellulaire [11, 65]. Les HSP90 facilitent la rapidité et la fluidité des réponses cellulaires lors du développement et de la régénérescence tissulaire en favorisant et en stabilisant la conformation des protéines de signalisation très rapidement requises pour répondre à des signaux extracellulaires [65].

4.3.3 Les HSP27

Les HSP27 sont synthétisées principalement dans les astrocytes en réponse à une ischémie. Cette famille ne contient que trois membres : HSP- β 1 à β 3. Ces protéines ont un rôle de chaperonnes et de cytoprotection grâce à leurs fonctions de contrôle de la polymérisation des filaments d'actine ainsi que de la stabilisation des protéines du cytosquelette tels les filaments intermédiaires et les filaments gliaux. Elles sont capables de promouvoir la survie cellulaire lors d'expositions aux rayons U.V., de l'induction de l'apoptose par le TNF et de l'induction de la nécrose par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [63]. La dénaturation protéique causée par de tels agents favorise l'activation des HSP27 qui s'assemblent entre elles afin de former de larges complexes. Ces complexes ont pour fonction de stabiliser les protéines dénaturées et de favoriser leur repliement de façon ATP-indépendante.

4.3.4 Ubiquitine

L'ubiquitine est l'une des plus petites protéines membres des HSP. Elle est impliquée comme chaperonne et comme molécule identificatrice de dégradation par le protéasome [63, 66]. L'ubiquitine est impliquée durant l'activation de NF- κ B en favorisant la dégradation de I κ B. Elle est aussi impliquée dans la dégradation des HSF une fois l'induction des HSP terminée et aussi lors de l'apoptose induite par le TNF [63, 66].

5. Le cancer

5.1 Généralités

Le cancer est un ensemble de maladies caractérisées par une division cellulaire échappant au contrôle des mécanismes de croissance et de division d'un organisme. On peut regrouper les modifications ou altérations possibles menant au cancer en six catégories [11] :

1. Altération au niveau du métabolisme cellulaire
2. Insensibilité à l'inhibition de croissance
3. Capacité d'échapper à la PCD
4. Fonction d'angiogénèse
5. Croissance autosuffisante
6. Potentiel de réplication infinie
7. Invasion des tissus adjacents et métastase dans d'autres organes

L'une des toutes premières altérations à survenir chez les cellules tumorales est la croissance chaotique incontrôlable. Les cellules deviennent insensibles aux facteurs de régulation et à l'inhibition de contact, se multipliant de façon anarchique et désordonnée jusqu'à épuisement des ressources disponibles. Ces cellules sont dites «immortelles», ce qui implique une modification génétique leur ayant permis d'acquérir un potentiel de réplication infini (à condition d'avoir les nutriments nécessaires disponibles). On parle d'immortalité lorsqu'on compare ces cellules avec des cellules saines qui ne peuvent se diviser au-delà de vingt à cinquante générations. La division anormale ne constitue pas la seule caractéristique des cellules malignes.

Les principales modifications que l'on retrouve dans des tissus cancéreux sont : un nombre anormal de chromosomes, des modifications du métabolisme et des modifications de l'expression des récepteurs membranaires suite à la synthèse de nouvelles protéines ou suite à l'inhibition des marqueurs de reconnaissance typiques modifiant les liens intercellulaires environnants ou avec la matrice basale [67].

Normalement les cellules présentant des anomalies moléculaires ou des récepteurs membranaires anormaux sont reconnues par le système immunitaire (lymphocytes T, cellules «natural killer» (NK)) et détruites dès que la transformation est détectée. Cependant, il arrive que ces cellules puissent échapper à cette reconnaissance et se mettre à proliférer au point de former une masse appelée tumeur (néoplasme). On distingue deux types de néoplasme soient bénin et malin. Les tumeurs bénignes ont comme caractéristique de demeurer localisées sans chercher à envahir d'autres tissus. Par contre, les tumeurs malignes prolifèrent et, par un phénomène de métastase, envahissent d'autres tissus dans le but de former de nouveaux néoplasmes [67].

5.2 Facteurs de risque

Le cancer provient souvent d'une série de mutations génétiques qui occasionnent une modification de l'expression et de l'activité de diverses protéines. L'origine de ces modifications peut être en partie attribuable à des facteurs environnementaux et/ou physiologiques, à de mauvaises habitudes de vie ou à une inhibition des systèmes de réparation de l'ADN ou à une modification de l'ADN [67-69].

5.2.1 Les facteurs environnementaux

On appelle facteurs environnementaux tous les facteurs cancérigènes auxquels l'être humain est exposé dans la vie quotidienne et ne pouvant être évités. Les deux groupes les plus importants de cette catégorie sont les radiations et les stress chimiques [67, 69].

5.2.1.1 Les radiations

L'environnement de l'être humain est constamment bombardé de radiations de diverses natures provenant de plusieurs sources différentes. Il est possible de distinguer deux types de radiations : les non ionisantes (onde électromagnétique) et les ionisantes (radioactivité) [71].

5.2.1.1.1 Les radiations non ionisantes

Les radiations non ionisantes sont produites à l'intérieur du spectre électromagnétique. Leur caractéristique commune est qu'elles ne possèdent pas suffisamment d'énergie pour ioniser un atome. En se basant sur le spectre de la lumière, on peut les diviser en cinq grandes catégories grâce à leur longueur d'onde en débutant avec les plus énergétiques :

1. Les rayons ultraviolets (UV) de l'ordre de 1 nm à 380 nm
2. Le spectre du visible, perçu par l'œil humain de l'ordre de 380 nm à 720 nm
3. Les rayons infrarouges de l'ordre de 720 nm à 10^6 nm
4. Les micro-ondes de l'ordre de 10^6 nm à 1 m
5. Les ondes radio de l'ordre de 1 m à 10^3 m

Les rayons UV seraient, parmi les radiations non ionisantes, les plus dommageables. Ils seraient liés aux causes de la majorité des cancers de la peau (mélanomes) [71]. Les rayons UV, très énergétiques, possèdent un pouvoir de pénétration suffisant pour endommager l'ADN des cellules de la peau et des yeux.

5.2.1.1.2 Les radiations ionisantes

La radioactivité est la partie la plus énergétique du spectre électromagnétique. Elle est constituée principalement des rayons X et gamma (γ) ainsi que des particules radioactives alpha (α) et bêta (β) [71]. Les émetteurs constants de radioactivité proviennent de trois sources :

1. Radiation cosmique (rayons γ)
2. Radiation provenant de la fission de notre soleil (rayons γ et particules α et β)
3. Radiation provenant des matériaux à l'intérieur de la couche terrestre (rayons γ et particules α et β)

Les diverses particules émises lors de la radioactivité possèdent toutes des caractéristiques différentes en ce qui concerne leur composition et leur potentiel de pénétration. Les particules α sont constituées de deux protons et deux neutrons. Elles sont chargées positivement et possèdent une grande énergie. Leurs distances de pénétration équivalent à l'épaisseur de quelques feuilles de papier. Par contre, dû à leur grande énergie, les dommages causés par les particules α sur la peau sont considérables, puisque l'énergie se dissipe en un point seulement et entraîne l'ionisation de nombreuses protéines dans les cellules touchées.

Les particules β sont constituées d'un électron (chargé négativement) émis lors d'une désintégration d'un noyau radioactif. Celles-ci ne sont pas très énergétiques mais leur petite taille leur confère un pouvoir de pénétration assez important. Elles sont arrêtées par une épaisseur de quelques centimètres de plomb. Le danger de ces particules consiste en la création de mutations dans l'ADN des cellules souches de l'hématopoïèse (cellules souches du sang), pouvant entraîner la formation de cancer de type hématopoïétique.

Les rayons γ sont des ondes électromagnétiques ressemblant aux rayons X mais possédant une plus grande énergie. Le potentiel de pénétration est tel qu'ils ne sont arrêtés que par plusieurs mètres de béton. Ils peuvent donc aisément traverser le corps humain, sans toutefois causer trop de dégâts [67].

5.2.1.2 Les stress chimiques

Le stress chimique provient principalement des agents chimiques qui pénètrent dans l'organisme par inhalation, par contact avec la peau ou par injection. Ils peuvent encourir des dommages dans les cellules des organes de la voie de pénétration ou bien au niveau des organes cibles. Parmi les agents de stress chimique, on retrouve des produits tels que les formaldéhydes (créés lors de la cuisson de l'huile à très haute température), le benzène et ses dérivés, l'acroléine, des médicaments ainsi que divers polluants environnementaux. Ces produits sont reconnus comme pouvant occasionner le cancer des poumons, de la bouche, des intestins et des autres organes reliés au tube digestif.

5.2.2 Les mauvaises habitudes de vie

De simples habitudes de vie peuvent augmenter grandement les probabilités de développer un cancer. Durant la dernière décennie, de nombreuses études ont réussi à démontrer que certaines habitudes de vie pouvaient avoir un effet néfaste sur la santé et favorisaient grandement la propension à développer une tumeur. Les deux plus grandes causes établies sont le tabagisme et la mauvaise alimentation. Il en existe bien sûr de nombreux autres, comme la sédentarité, l'alcoolisme et le lieu de résidence (en ville ou proche de gisements naturels d'éléments radioactifs). Cependant, à eux seuls, le tabagisme et l'alimentation représentent environ 50% du taux de mortalité relié aux cancers [68].

5.2.2.1 Le tabagisme

Au Canada seulement, environ 30% du taux de mortalité des personnes atteintes du cancer est relié directement au tabac et ses dérivés. Les dangers du tabac sont dus à la présence d'une soixantaine de substances cancérigènes et d'environ quatre mille produits chimiques et autres dérivés toxiques émis lors de sa combustion [72, 73]. On note la présence de produits tels que l'acroléine, les benzopyrènes et autres dérivés nitrés [73, 74]. Des études ont récemment réussi à démontrer un lien direct entre le tabac et le développement d'un cancer. La nicotine serait impliquée dans la carcinogenèse en induisant une phosphorylation de la protéine Bcl-2. Cette phosphorylation a pour effet d'inactiver la protéine et de créer un dérèglement électrochimique de la mitochondrie [68, 72, 73, 75].

5.2.2.2 La mauvaise alimentation

Une alimentation riche en gras saturés et en alcool associée à une diète faible en fibres et en antioxydants constituerait, selon les statistiques, en la deuxième cause de mortalité reliée au développement du cancer au Canada. Ce type d'alimentation a été observé, selon plusieurs études, comme favorisant l'apparition de nombreux types de cancer. Un régime alimentaire riche en gras saturés et faible en fibres aurait vraisemblablement une influence sur la flore intestinale ainsi que sur les sécrétions du foie et du pancréas. La restauration rapide ou «fast-food», servant ce type de régime dans la plupart des pays industrialisés, augmenterait de façon considérable la propension à développer un cancer. En effet, les produits de synthèse résultant d'une cuisson à l'huile (ex : formaldéhydes et acroléine) et les agents de conservation

augmentent l'exposition du tube digestif et intestinal à de nombreuses substances cancérogènes ou mutagènes contenues dans ceux-ci [68].

5.2.3 Modifications génétiques et inhibition des systèmes de réparation de l'ADN

Les changements de l'expression génique peuvent entraîner de sévères conséquences à un organisme. Ces changements peuvent être dus à des modifications directes de l'ADN comme, par exemple, une méthylation sur un gène important, une mutation dans la séquence d'un site de liaison d'un répresseur inhibant la synthèse d'un proto-oncogène ou même une mutation dans la région codante d'un gène. Comme vu dans les paragraphes précédents, ces modifications peuvent résulter de divers phénomènes, tels les radiations, les substances chimiques ou même suite à une infection virale.

Lors d'une infection virale, les virus ont besoin de la machinerie cellulaire pour réussir à se répliquer. Cette activité de réplication induit un métabolisme différent des gènes de croissance et de multiplication cellulaire. Cette modification peut entraîner une croissance incontrôlée et par ce fait une tumorigénèse cellulaire [15].

Trois grandes familles génomiques ont été identifiées comme pouvant mener, suite à une modification ou à une mutation de leur expression, à la cancérogenèse. Ces familles sont constituées des **proto-oncogènes**, des gènes **suppresseurs de tumeur** et du **système de réparation** de l'ADN.

1. Les *proto-oncogènes* sont impliqués durant la croissance, dans la division cellulaire et dans les mécanismes de survie cellulaire (ex : Bcl-2, BAX, BAD). Une augmentation de ces activités aurait comme effet une croissance incontrôlée ainsi qu'une inhibition de l'activation de la PCD.
2. Les *suppresseurs tumoraux* ont un rôle dans l'inhibition de la croissance cellulaire (ex : gène du rétinoblastome (Rb), p53). L'altération de l'expression des protéines de cette famille entraîne une croissance chaotique des cellules.
3. Le *système de réparation* de l'ADN englobe tous les gènes ayant une activité dans le maintien et la vérification de l'exactitude de la réplication de l'ADN, ainsi que les gènes impliqués lors de la division cellulaire, dans la réparation de l'ADN (lorsque celui-ci a subi des mutations occasionnées par divers stress) et aussi dans la synthèse des gènes de la télomérase. Une défaillance de ce système permet et accélère le développement des cellules ayant subi des mutations. L'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN peut permettre à des mutations ou des séquences inconnues (lors d'infection virale) de s'insérer dans l'ADN et de se propager lors de mitoses subséquentes. Une surexpression des gènes de la télomérase permet une élongation des télomères et une installation d'une immortalité cellulaire [76].

5.3 Le cancer et NF- κ B

L'étude des fonctions des gènes activés par NF- κ B a permis d'établir une relation entre certains types de cancer et ces facteurs de transcription [15, 19]. Il a été montré chez plusieurs lignées murines que l'activation de NF- κ B, par son rôle dans les processus d'inflammation, favorise la progression et l'activité métastatique de certains types de cancer [15]. La voie d'activation IKK β -dépendante de NF- κ B joue d'ailleurs un rôle critique dans la prolifération cellulaire dans le cancer du colon chez la souris [77]. Dans le cas du cancer hépatocellulaire, l'activation répétée des processus inflammatoires et la synthèse de TNF- α par le tissu endothélial environnant favorisent l'activation chronique de NF- κ B. Cette activation chronique augmente la probabilité de transformation de cellules hépatiques en carcinome. De ce fait, des recherches ont démontré que l'inactivation de NF- κ B permet l'inhibition des processus de tuméfaction [78]. Le complexe IK β /NF- κ B joue un rôle primordial dans la carcinogenèse puisqu'il peut intervenir dans l'inhibition de la PCD (par apoptose ou nécrose) [15, 19]. Il a été noté dans plusieurs types de cancers, qu'une expression beaucoup plus élevée de NF- κ B, contribue à la survie des cellules malignes (*figure 1.7*). Ces résultats permettent d'entrevoir la possibilité d'un traitement agissant sur la phosphorylation du complexe IK β /NF- κ B ou sur l'inhibition de NF- κ B comme étant une voie intéressante sur le traitement de certains types de cancers [15].

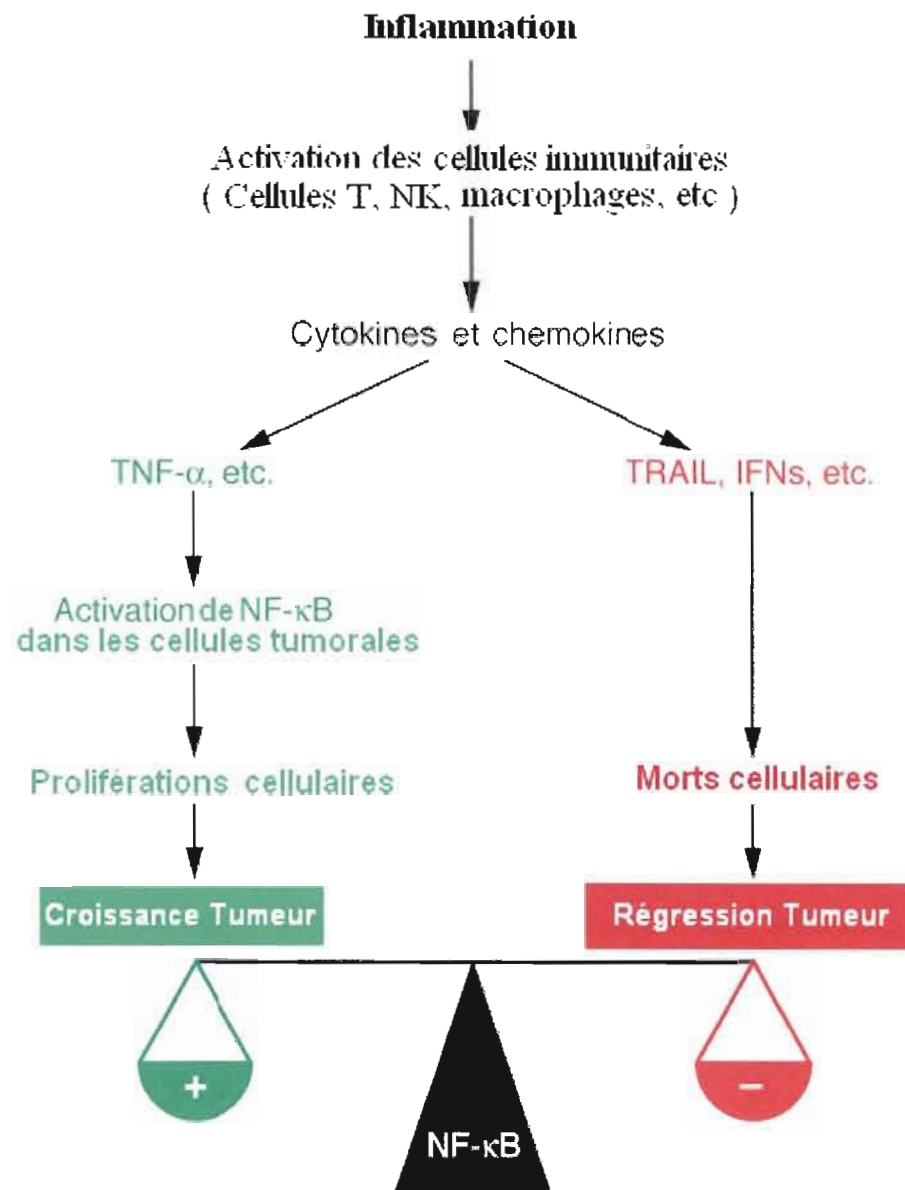


Figure 1. 7: Inflammation, activation de NF-κB et la croissance ou la mort tumorale.

Le phénomène d'inflammation et de l'activation des cellules immunitaires peut activer un grand nombre de cytokines et chimiokines. L'activation de TNF-α peut résulter en une croissance cellulaire tandis que l'activation de molécules telles que TRAIL et IFN résulte en une régression tumorale.

(Adapté de :Luo J.et al.,2005 [19]).

5.4 Rôle des HSP lors de la formation de carcinome

La création des cellules cancéreuses résulte de légères modifications, d'inhibition de protéines pro-apoptotiques ou bien de la surexpression de protéines favorisant la survie cellulaire. L'établissement et la croissance de cette transformation cellulaire sont dépendantes du taux de synthèse des HSP90. Les HSP90 jouent un rôle important comme chaperonnes dans le maintien de la conformation tertiaire opérationnelle des protéines instables dont celles ayant subi une mutation. Le cancer tire profit dans bien des cas de la machinerie cellulaire des HSP pour acquérir une cytoprotection contre les inducteurs de PCD (*figure 1.8*) [11]. Il n'est donc pas surprenant de mesurer un taux de synthèse beaucoup plus élevé des HSP90 dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains.

Le récepteur-2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) et les protéines induites par son activation sont responsables de la survie et de la croissance cellulaire, d'où leur importance dans le maintien d'un carcinome et de sa prolifération [11]. La stabilisation et l'activité du proto-oncogène HER2 ainsi que des protéines induites par celui-ci, telles que les protéine-kinases Akt et Raf-1, requièrent l'action des HSP90 (*figure 1.8*) [65].

Il existe un complexe de chaperonnes jouant un rôle très important dans la prolifération du cancer. Il est constitué majoritairement par les HSP90 mais aussi par Hop, une protéine de pliage, par p23, une protéine permettant le choix du substrat, et par le complexe HSP70-HSP 40 (*tableau 1 2*). Ce complexe intervient lors de la formation de l'interaction entre les HSP90 et un substrat [11]. Un autre rôle des HSP90 dans le cancer provient de l'aide qu'elles apportent pour faciliter l'émergence d'un polymorphisme tumoral en supportant et en stabilisant les conformations mutantes de plusieurs protéines proto-oncogène telles p53 et Bcr-Abl [11].

Il arrive parfois qu'une modification se retrouve dans les HSP90. Cette modification, appelée HSP90N, est caractérisée par une délétion au niveau du site de liaison de l'ATP. L'inhibition résultante de l'activité ATPase empêche le relâchement protéique, favorisant ainsi la stabilisation des protéines et occasionnant par le même fait une cytoprotection accrue aux cellules, permettant ainsi une croissance autonome (sans facteur de croissance externe) du cancer [11, 65].

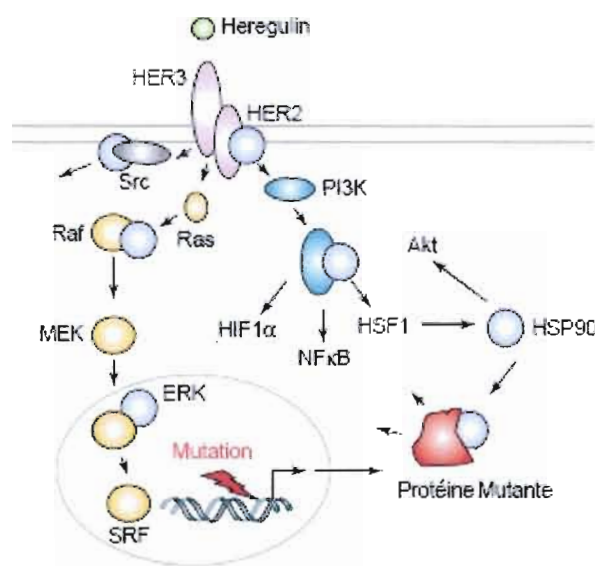


Figure 1. 8: Implication des HSP90 dans la stabilisation de protéines mutantes.

L'activation des HSP90 favorise une tumorigénèse cellulaire ainsi que l'activité métastatique du cancer en permettant de stabiliser les protéines mutantes qui peuvent intervenir à divers niveaux afin de stimuler la croissance tumorale.

(Adapté de : Calderwood S. et al., 2006 [63])

5.4.1 Invasion et métastase grâce aux HSP

Depuis longtemps, la caractérisation de la morbidité des cancers est établie en fonction de leur propension à être invasif dans les tissus environnants et de leur activité métastatique vers d'autres organes. Les études ont démontré que les cancers caractérisés par une surexpression de HSF1 et des HSP avaient une nette tendance à être plus invasifs dans leur microenvironnement et à avoir une activité métastatique beaucoup plus élevée [11]. Les mécanismes expliquant ce phénomène n'ont pas encore été clairement détaillés, mais il a été observé que l'héréguline favoriserait la perte de contact entre cellules et avec la matrice basale. L'activation de l'héréguline nécessiterait l'activation préalable du gène HSF1, aussi responsable de la synthèse de nombreuses HSP (*figure 1.8*). La perte de contact avec la membrane basale est une étape essentielle permettant aux cellules tumorales de se détacher et de migrer. De nombreuses études ont corroboré une corrélation positive entre l'augmentation des HSP, comme les HSP27 et les HSP70, due à l'activation de HSF1, et l'augmentation de l'activité métastatique et invasive des tumeurs [11, 65].

5.4.2 Traitement possible de cancer lié aux HSP90.

L'identification des molécules impliquées dans certains types de cancer a permis au domaine pharmaceutique de fabriquer des agents thérapeutiques. Il en va de même dans le cas de cancers impliquant une surexpression des HSP90 occasionnée par la synthèse d'une protéine instable mutée, associée à la survie et à la croissance cellulaire. L'inhibition des HSP90 par un agent chimique spécifique (de la famille des ansamycines qui ciblent le site ATPasique) a permis d'inhiber la croissance tumorale grâce au point de contrôle cellulaire interne en G₁ et d'activer l'apoptose de ces cellules. Le développement de ces traitements a permis de

comprendre à quel point les HSP90 sont nécessaires et possèdent un rôle-clé quant à l'induction d'une croissance autosuffisante [11, 65]. L'implication des HSP90 possédant un rôle dans l'invasion des tissus lors de la métastase a récemment été rapporté [65]. Le mécanisme entourant le phénomène reste toutefois nébuleux et d'autres études demeurent nécessaires afin d'élucider ce phénomène.

La maladie d'Alzheimer et le cancer affectent de plus en plus de gens chaque année. Cependant, la recherche biomédicale est encore loin d'être en mesure de prévenir ou de guérir adéquatement ces maladies puisqu'elle en est encore à découvrir les fonctionnements de ces pathologies et que de nombreuses autres études sont nécessaires.

6. Cellules Neuro 2A

La souche cellulaire Neuro 2A est une lignée cancéreuse formée à partir d'un neuroblastome de cerveau de souris et possédant la capacité de produire de la tubuline et de l'acétylcholinestérase [79]. Les cellules Neuro 2A ont été choisies dans le présent travail pour deux raisons principalement. Premièrement, les Neuro 2A ont été beaucoup moins étudiées que d'autres types cellulaires de nature neuronale (tel les cellules PC12) et les voies de signalisation activées dans ces cellules en réponse à divers stress pro-apoptotiques ne sont donc pas tout à fait connues. Deuxièmement, les Neuro 2A possèdent une grande résistance face à divers stress contrairement à d'autres types neuronaux [79] et la compréhension des mécanismes de résistance pourrait aider à perfectionner les approches thérapeutiques.

Neuro-2a

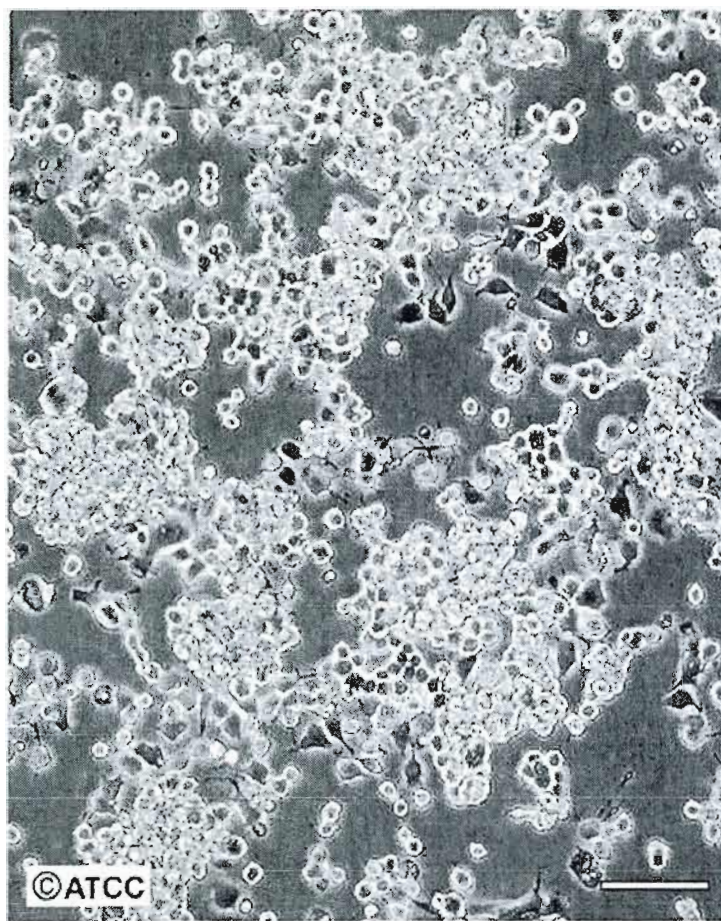
Échelle = 100 μ M

Figure 1. 9 : Photographie de cellules Neuro 2A à 80% de confluence.

7. Objectifs du projet

L'exposition à divers stress cellulaires peut induire l'apoptose mais l'activation de l'une ou l'autre des voies de signalisation apoptotiques dépend du stress ainsi que du type cellulaire. Le présent travail porte sur l'étude de la réponse de la lignée cellulaire Neuro 2A à deux stress pouvant déclencher l'apoptose : le stress oxydatif et le choc thermique. Comme les cellules Neuro 2A ont à la fois une nature neuronale et une nature cancéreuse, et sont d'origine cérébrale, l'étude de leur réponse aux deux stress pourrait fournir des informations utiles pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et/ou de tumeurs neuronales du cerveau.

Les cellules sont soumises à divers stress durant leur existence, les plus fréquents étant essentiellement le stress oxydatif et le choc thermique. Le stress oxydatif est occasionné lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire et par la présence de ROS qui provoquent l'oxydation des protéines et des lipides. Le choc thermique peut survenir lorsque l'organisme combat une infection ou lors d'une insolation. Ces deux types de stress ont déjà été mis en évidence dans la maladie d'Alzheimer. Dans le cas du stress oxydatif, une augmentation de la peroxydation des lipides et de certaines protéines a été rapportée, tandis que dans celui du choc thermique, une augmentation accrue des HSP dans le cytosol a été détectée [25, 55, 63]. Certaines études ont aussi souligné une augmentation de NF- κ B dans les cellules neuronales durant cette maladie, d'où l'importance d'étudier l'induction de l'apoptose dans les cellules neuronales ainsi que le lien entre l'apoptose et NF- κ B. Nous venons de voir que des ROS et des HSP sont impliquées dans divers types de cancer. Dans le cadre de ce projet, nous avons poursuivi les objectifs suivants :

1. Déterminer si le stress oxydatif (H_2O_2) et le choc thermique ($40-43^{\circ}C$) peuvent chacun déclencher l'apoptose dans les cellules Neuro 2A. Les conditions optimales d'induction de l'apoptose pour chaque stress ont été établies par analyse microscopique de la condensation de la chromatine avec le colorant Hoescht.
2. Déterminer si l'apoptose induite par H_2O_2 ou par une température élevée implique l'activation de la voie du récepteur de mort et/ou celle de la voie mitochondriale. Pour cela, l'activité des caspases initiatrices 8 et 9 a été mesurée, et les changements du potentiel membranaire mitochondrial ont été suivis par cytométrie de flux.
3. Déterminer si les caspases exécutrices 3, 6 et 7 sont impliquées. L'activité de ces caspases a été mesurée *in vitro* avec des substrats modèles et/ou *in vivo*, par immunobuvardage d'une substrat endogène, la lamine A
4. Évaluer l'importance de NF- κ B dans le processus apoptotique activé par chacun des deux stress.

Bay 11-7082 est un inhibiteur irréversible empêchant la phosphorylation de I κ B lorsque celui-ci est lié à NF- κ B. Cette inhibition empêche la translocation nucléaire de NF- κ B. Notre hypothèse de travail vise à démontrer que l'inhibition de NF- κ B aura un effet pro-apoptotique suite à un stress imposé aux cellules comme le stress oxydatif ou le choc thermique. L'effet d'une inhibition de NF- κ B par le Bay 11-7082 lors de l'activation de l'apoptose a été mesuré suite à un stress oxydatif ou thermique

suivant les mêmes procédés mentionnés ci-haut (coloration au Hoescht, activité des caspases).

Ces expériences permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de la réponse cellulaire à un stress oxydatif ainsi qu'à un stress thermique neurologiques. Ils permettront de déterminer l'implication de NF- κ B dans les phénomènes d'induction de l'apoptose ou de survie cellulaire suite à ces stress. L'ensemble pourrait mener à comprendre les mécanismes impliqués dans la formation d'un cancer et de la maladie d'Alzheimer et d'être en mesure d'octroyer de meilleurs traitements aux personnes atteintes.

II. Matériels et méthodes

1. *Culture cellulaire*

La culture des cellules Neuro 2A (ATCC) s'est effectuée en monocouche jusqu'à confluence dans des flacons (Sartedt, Saint-Laurent, Québec, Canada), à 37°C, en présence de 5% CO₂. Le milieu de culture utilisé est le DMEM/F12 (Gibco Canada, Burlington, ON) supplémenté de 10% (vol/vol) de sérum foetal bovin, d'antibiotiques (pénicilline 50 unités/mL et streptomycine 50µg/mL). Un changement de milieu de culture était effectué vingt-quatre heures avant d'effectuer un passage cellulaire ou une expérience. Des cultures entre le 10^e et le 50^e passage ont été utilisées pour réaliser les expériences. Le passage et la récolte des cellules ont été effectués par le retrait du milieu de culture suivi de l'ajout de trypsine-EDTA (0,5 mg/ml de trypsine et 0,2mg/ml de EDTA). L'inhibition de l'activité de la trypsine s'effectuait par l'ajout de milieu de culture complet (DMEM/F12, sérum, pénicilline et streptomycine). La suspension cellulaire était ensuite transférée dans un tube et centrifugée à 1000g durant trois minutes. Le culot de cellules était resuspendu dans trois mL de milieu. Les cellules ont été divisées suivant un ratio 1 :3.

Les cellules ont été soumises à deux types de stress durant les expériences, soient le stress oxydatif et le choc thermique. Suite à la centrifugation du culot, un échantillon d'environ 300 µl était prélevé afin d'effectuer un décompte cellulaire grâce à un hémacymètre.

2. Stress oxydatif

Les expériences concernant le stress oxydatif ont toutes été effectuées sur des cellules Neuro 2A poussées en couche mince dans des flacons. Les expériences ont été effectuées sur en présence de milieu DMEM/F12 complet et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) frais. Pour établir les conditions d'induction de l'apoptose, les cellules ont été mises en contact avec des concentrations H_2O_2 variant de 0 à 50 μM , et ce durant des périodes de trente minutes ou d'une heure à 37°C, 5% CO_2 . Suite au stress oxydatif, les cellules ont été récupérées selon la méthode décrite précédemment (section 1) sauf que les culots cellulaires étaient resuspendus à l'aide d'un tampon de phosphate salin (PBS) contenant 1% d'albumine de sérum bovin (PBS/BSA 1%).

L'inhibiteur Bay 11-7082 (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA, 4 μM) était ajouté en présence des cellules trente minutes avant l'initiation du stress oxydatif. Suite à cette incubation, le milieu de culture des cellules était remplacé par du milieu de culture complet ne contenant pas l'inhibiteur.

3. Stress par choc thermique

Les expériences sur l'induction d'un choc thermique ont été réalisées dans des bains-maries dans lesquels la température de l'eau était fixée à 37°C, 40°C, 42°C ou 43°C ($\pm 0,02^\circ C$). Des cellules fraîchement recueillies provenant de flacons de culture à confluence ont été transférées dans des microtubes de 1,5 mL contenant du milieu DMEM/F12 complet ou une solution de 10 mM glucose dans du PBS/BSA 1%,. Les cellules ont été incubées durant des périodes de trente minutes, une heure ou deux heures, dépendamment des manipulations subséquentes désirées. Les cellules ont par

la suite été lavées et récupérées par centrifugation (1000g, trois minutes) dans du PBS/BSA 1%.

L'inhibiteur Bay 11-7082 (4 μ M) était ajouté aux cellules trente minutes avant application du choc thermique. À la fin du choc thermique, les cellules ont été récupérées selon la procédure précédemment décrite.

4. Cinétique d'activité des caspases

Dans le cas des expériences sur les cinétiques enzymatiques des caspases, une quantité de $0,5 \times 10^6$ cellules était utilisée durant une période de trente minutes pour l'activité des caspases 8 et 9, et pendant une heure pour l'activité des caspases 3 et 6. Suivant un stress oxydatif ou un choc thermique, les cellules ont été resuspendues dans 50 μ L de tampon de réaction des caspases (20 mM acide piperazine-N, N-bis(2-éthanesulfonique) (PIPES), 100 mM NaCl, 0,1% acide 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonique (CHAPS), 10% sucrose, pH 7.2) [6]. Les suspensions ont été transférées dans les puits d'une microplaque et incubées au congélateur à -20°C durant vingt minutes pour permettre la lyse des cellules. Un volume de 25 μ L de tampon de réaction des caspases a été rajouté aux cellules lysées. La plaque fut ensuite incubée dix minutes à 37°C avant de compléter le volume final à 100 μ l à l'aide du substrat fluorescent spécifique à la caspase d'intérêt. Le blanc servant à calibrer l'appareil entre chaque lecture est constitué de 75 μ L du tampon des caspases et de 25 μ l (concentration finale de 200 μ M) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) du substrat fluorescent de la caspase analysée ; caspase 3 : Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Amino-4-Méthyl-Coumarin (AMC), caspase 6 : Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC, caspase 7 : (DNP)KWGDVQDV-AMC, caspase 8 : Z-Ile-Glu-Thr-Asp-Amino-4-Trifluorométhyl Coumarin (AFC), caspase 9 : Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-AFC. Les

lectures de la réaction enzymatique ont été prises durant une période de trente minutes à raison d'une lecture par minute avec un spectrofluorimètre (Spectra Max Gemini, Molecular Device, Sunnyvale, CA). De plus, les longueurs d'onde pour l'excitation et l'émission étaient spécifiques des dosages de chaque caspase ; caspases 3 et 6: λ_{380} et λ_{460} nm, caspases 8 et 9: λ_{400} et λ_{505} nm. Les résultats des cinétiques des caspases des cellules exposées aux stress ont été comparés avec ceux des cellules témoins non traitées ayant une activité fixée à 1,0.

5. Condensation de la chromatine

Les tests sur la condensation de la chromatique ont été effectués sur des cultures en couche mince initiées avec $1,0 \times 10^6$ cellules en présence de DMEM/F12 complet. Pour obtenir les conditions d'induction de l'apoptose, les cellules ont été mises en présence de H_2O_2 [0 à 50 μM] pendant quatre heures à 37°C, 5% CO_2 pour le stress oxydatif.

Suite à ce stress, le milieu est remplacé par du PBS/BSA 1%, 10 mM glucose ainsi que 50 $\mu\text{g/mL}$ de Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA). Le réactif de Hoechst 33258 est une sonde fluorescente permettant le marquage en bleu de la chromatine du noyau. L'incubation en présence du réactif de Hoechst a duré quinze minutes à 37°C, 5% CO_2 . Le milieu a ensuite été remplacé par de l'iodure de propidium (PI) (concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Chemical Co.), permettant de visualiser les cellules nécrotiques (fluorescence rouge) sous une lampe U.V. Les cellules ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss inverted microscope model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC, Canada). Environ 300 cellules ont été analysées par échantillon grâce au logiciel «Northern Eclipse».

Les cellules ont été classées selon les critères suivants : (a) cellules vivantes (noyau normal, chromatine légèrement bleutée) ; (b) cellule en apoptose ayant une membrane intacte (chromatine bleu très brillante intacte ou fragmentée) ; (c) cellules nécrotiques (rouge, grossissement du noyau) [73, 79] Le ratio des cellules en apoptose et en nécrose a été effectué selon le nombre total de cellules.

Lors des tests en présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 (4 μ M), les cellules ont été incubées trente minutes en sa présence et par la suite, elles ont été mises en présence de H₂O₂ dans du milieu neuf, selon le protocole précédemment expliqué.

Lors du choc thermique (37° à 43°C), 1,0 x 10⁶ cellules étaient préalablement récoltées de cultures à confluence et resuspendues dans du PBS/BSA 1%, 10 mM glucose dans un microtube de 1,5 mL. Suite à deux heures d'incubation, le réactif de Hoechst (50 μ g/mL final) a été rajouté aux cellules pour une incubation de quinze minutes. Par la suite, les cellules ont été mises en présence du PI (1 mg/mL). Un volume de 50 μ L a été projeté sur lame de microscope à l'aide d'une cytocentrifugeuse (2000 rpm, trois minutes) pour être ensuite observé sous une lampe U.V. comme décrit précédemment.

Lors des tests en présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 (4 μ M), les cellules ont été incubées trente minutes en sa présence et par la suite, les cellules ont été recueillies selon le protocole précédemment expliqué.

6. Potentiel membranaire mitochondrial

Les tests sur le potentiel membranaire de la mitochondrie ont été réalisés sur $1,0 \times 10^6$ cellules Neuro 2A, suite à l'induction d'un stress oxydatif ou thermique. Le culot cellulaire de chaque échantillon a été resuspendu en présence de la sonde JC-1 (concentration finale de 5 $\mu\text{g/ml}$, Molecular Probe, Eugene, OR) dans du PBS/BSA 1%, 10 mM glucose, à 37°C durant 15 minutes. La JC-1 est une sonde fluorescente initialement verte (canal FL1 du cytomètre en flux) capable de se fixer aux parois des membranes de la mitochondrie (grâce à des pompes mitochondriales) et de former ensuite des agrégats à l'intérieur de celles-ci, changeant par ce fait la fluorescence de la sonde du vert au rouge (canal FL2) [81]. Lors d'une modification électrochimique des membranes de la mitochondrie, une diminution de l'intensité de fluorescence rouge a été observée. La centrifugation (1000g, trois minutes) à l'aide de PBS/BSA 1% a permis d'arrêter l'incorporation de JC-1 dans les cellules. Le culot cellulaire a été resuspendu dans du PBS/BSA 1% auquel on a ajouté du PI (concentration finale de 1 mg/mL) afin de mesurer la viabilité cellulaire [73]. Le potentiel membranaire des mitochondries a été mesuré par cytométrie de flux grâce à un FacScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) à une longueur d'onde de 585 nm pour le PI (FL3) et 530 nm pour la JC-1. Un nombre de 10 000 cellules a été compté pour chacune des conditions de stress.

Le témoin positif pour ce test a été effectué grâce au p-trifluorométhoxy-phényl-hydrazone (Fccp, concentration finale de 5 $\mu\text{g/mL}$, reconnu pour induire la dépolarisation membranaire). Les cellules témoins ont été incubées pendant une heure en présence de Fccp puis traitées avec la sonde JC-1 comme expliqué précédemment pour les autres cellules.

Lors des tests en présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 (4 μ M), les cellules ont été incubées trente minutes en sa présence et par la suite, les cellules ont été recueillies selon le protocole précédemment expliqué et soumises au choc thermique dans du milieu neuf.

7. Électrophorèse SDS-PAGE et buvardage de type western

Les buvardages de type Western ont été effectués à partir de cellules Neuro 2A cultivées dans du milieu DMEM/F12 complet à 37°C, 5% CO₂. Suite au stress désiré (oxydatif ou thermique), le culot cellulaire a été lavé deux fois par centrifugation (1000g, trois minutes) dans un tampon de lavage A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7.4). Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans un tampon de lyse H (20 mM d'acide morpholinopropanesulfonique, pH 7,0, 10% de glycérol, 80 mM de β -glycérophosphate, 5 mM d'EGTA, 0,5 mM d'EDTA, 1 mM de Na₃VO₄, 5 mM de Na₄P₂O₇, 50 mM de NaF, 1% de Triton X-100, 1 mM de dithiothréitol et des inhibiteurs de protéases), incubé à 4°C durant une heure [80]. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés (1000g, trois minutes) pour enlever les débris et les cellules non lysées et le surnageant a été conservé. Le dosage des protéines des échantillons a été effectué par la méthode de **Bradford** (1976). Des échantillons de 30 μ g de protéines solubilisées dans un tampon composé de 62.5 mM Tris/HCL, pH 6.8, 10% glycérol, 2% β -mercapto-éthanol et $2,5 \times 10^{-4}$ % de Bromophénol 6 ont été migrés par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (15% de polyacrylamide).

Le transfert des protéines a été effectué sur une membrane de polyvinylidène difluoré (PVDF). Les membranes ont été préalablement activées par un traitement dans le méthanol 100% durant 15 secondes, lavées dans de l'eau distillée puis équilibrées dans le tampon de transfert (2,5 mM Tris, 19,2 mM Glycine et 2,0% méthanol) durant 15 minutes. Les gels ont été déposés directement sur les membranes de PVDF pour un transfert d'une heure et demie en mode demi-sec. Ensuite, le blocage des membranes a été effectué grâce à une solution contenant du tampon Tris-salin (TBS) contenant 0.1% Tween-20 et 5% de lait écrémé, pH 7.4 durant toute la nuit.

Les membranes de PVDF ont été exposées à tour de rôle à divers anticorps primaires selon les protéines recherchées (caspases 3, 6, 9, lamine A et GAPDH). La révélation a été possible grâce à une incubation avec un anticorps secondaire approprié couplé à une peroxydase, puis avec un substrat chimioluminescent (réactif ECL luminol). Les signaux lumineux correspondant à des bandes de protéines ont été captés sur des films FUJI Super RX (FUJI medical, X-Ray film; 20,3x25, 4cm). Les films ont été analysés par densitométrie, permettant de mettre en évidence les diminutions ou les augmentations d'expression de certaines protéines

8. Statistiques

Les expériences ont été répétées plusieurs fois (un minimum de 3 cultures différentes) et ont été réalisées en triplicata pour chaque culture. Le tout a été présenté avec moyennes et les écarts moyens Les statistiques ont été analysées en utilisant le programme SPSS. Le test de Student a été utilisé pour déterminer si les valeurs étaient significativement différentes. Une valeur de $P < 0,05$ a été reconnue comme indiquant une différence significative.

III Résultats :

1. L'activation de l'apoptose par un stress oxydatif n'est que très légèrement affectée par le Bay 11-7082. Les Neuro 2A ont été exposées à un stress oxydatif par H_2O_2 (0 à 50 μM) durant quatre heures (figure **3.1A**). Avant l'induction du stress, certaines cellules avaient été mises en présence de l'inhibiteur Bay 11-782 (4 μM) durant trente minutes. La proportion de cellules apoptotiques et nécrotiques a été évaluée par coloration avec Hoescht 33258 et PI. Le taux d'induction maximum de l'apoptose sans prétraitement avec le Bay 11-7082 a été observé à 25 μM de H_2O_2 . À cette concentration de peroxyde, le taux d'apoptose était environ deux fois plus élevé comparativement aux cellules témoins et atteignait 23%. Le pourcentage de nécrose est très faible dans ces conditions, ne dépassant pas 2%. Le prétraitement avec Bay 11-7082 n'a pas modifié significativement le pourcentage d'apoptose de 25 à 45 μM de H_2O_2 mais a augmenté l'apoptose 7% à la plus haute concentration de H_2O_2 (50 μM). Le prétraitement n'a pas eu d'influence significative sur le % de nécrose. Le taux de cellules nécrotiques suite à l'induction du stress oxydatif est resté relativement stable pour toutes les concentrations de H_2O_2 et ce, même lors de l'inhibition de NF- κB avec le Bay 11-7082 (figure **3.1B**).

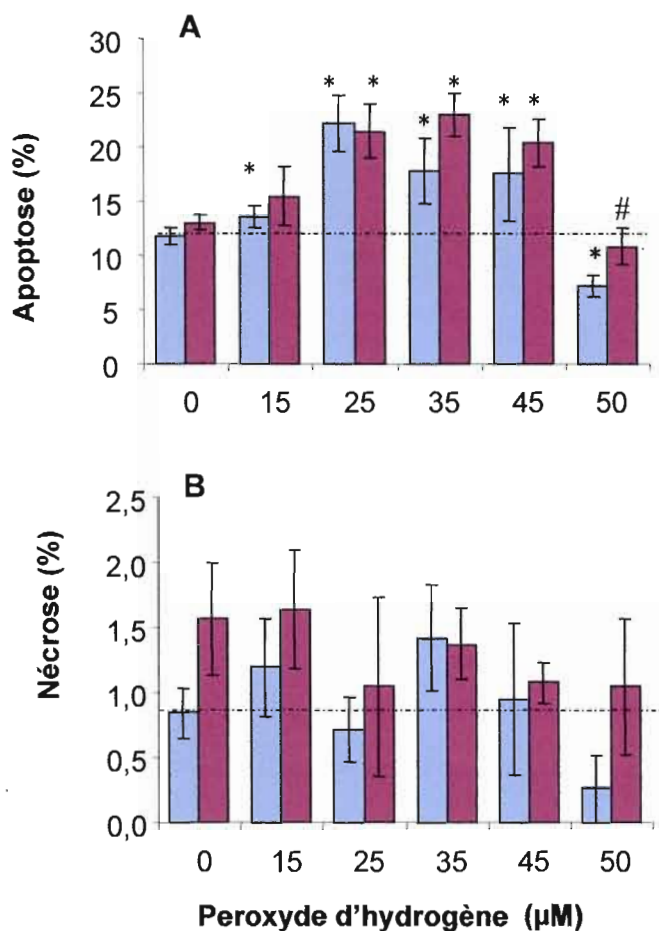


Figure 3. 1 : Condensation de la chromatine dans les cellules Neuro 2A exposées au H₂O₂ avec et sans prétraitement avec le Bay 11-7082

Des cellules Neuro 2A, non prétraitées (■) ou prétraitées (■) avec 4 µM de Bay 11-7082 pendant 30 minutes, ont été incubées à 37°C pendant quatre heures avec différentes concentrations de H₂O₂ dans du milieu de culture complet. La morphologie cellulaire a été évaluée sous microscope après coloration avec le Hoescht 33258 et le PI. La fraction des cellules en apoptose (A) et en nécrose (B) est exprimée en pourcentage des cellules totales de chaque échantillon. Un minimum de 300 cellules par échantillon a été analysé. Les résultats (moyenne ± écart-moyen) proviennent de cinq expériences. * indique une différence significative (p < 0,05) par rapport aux cellules témoins (sans Bay et sans H₂O₂). # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le Bay 11-7082

2. L'activation de l'apoptose par un stress thermique est affectée par Bay 11-7082.

La figure 3.2 montre les résultats de l'activation de l'apoptose suite à l'augmentation de la température. En absence de prétraitement avec le Bay 11-7082, l'exposition à 42°C double le taux d'apoptose (de 4 à 7%) et a peu d'effet sur le taux de nécrose (3%) par rapport à 37°C. À 43°C, le taux d'apoptose atteint 17% (quatre fois plus élevé qu'à 37°C) et le taux de nécrose monte à 7% (le double de celui observé à 37°C). Le prétraitement avec le Bay 11-7082 n'a pas d'influence sur les cellules cultivées à 37°C alors qu'il augmente ou a tendance à augmenter les taux d'apoptose et de nécrose à 42 et 43°C. À 42°C, le prétraitement influencerait davantage l'apoptose que la nécrose (passant de 7 à 13%) alors qu'à 43°C, on observe l'inverse (augmentation du taux de nécrose de 7 à 10%).

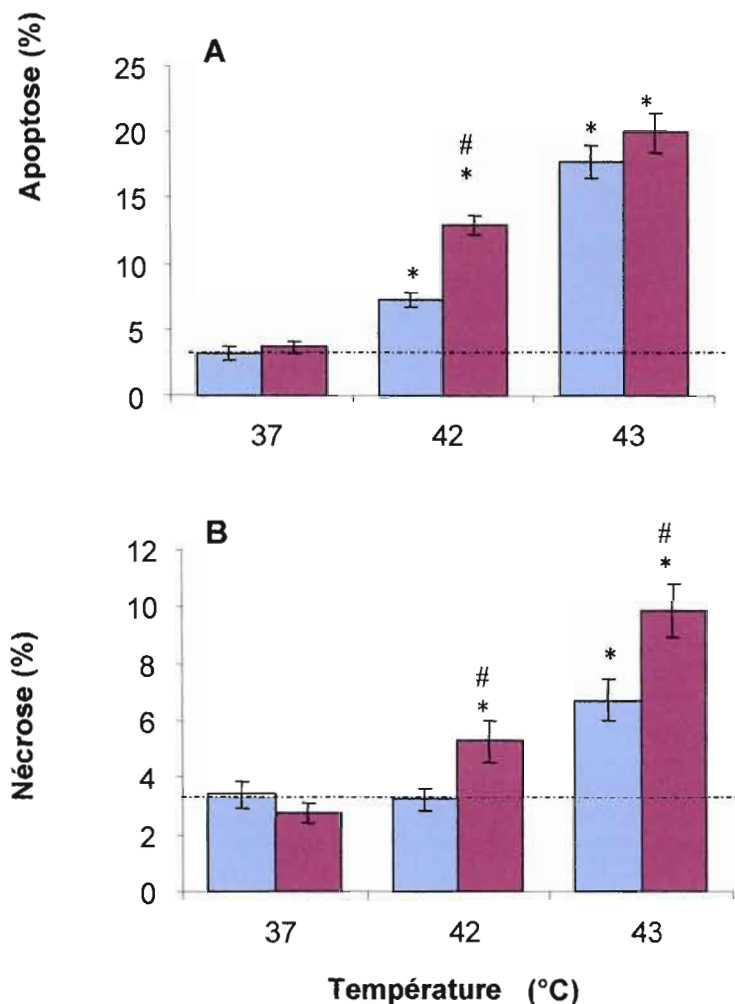


Figure 3. 2: Condensation de la chromatine dans les cellules Neuro 2A exposées à un choc thermique avec et sans prétraitement avec le Bay 11-7082

Des cellules Neuro 2A, non prétraitées (■) ou prétraitées (■) avec 4 μ M de Bay 11-7082 pendant trente minutes, ont été incubées à différentes températures pendant deux heures dans du milieu de culture complet. La morphologie cellulaire a été évaluée sous microscope après coloration avec le Hoescht 33258 et le PI. La fraction des cellules en apoptose (A) et en nécrose (B) est exprimée en pourcentage des cellules totales de chaque échantillon. Un minimum de 150 cellules par échantillon a été analysé. Les résultats (moyenne \pm écart-moyen) proviennent de neuf expériences. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (sans Bay et à 37°C). # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le Bay 11-7082

3. Le stress oxydatif induit l'apoptose par l'activation de la caspase 9.

Étant donné que l'apoptose est médiée par les caspases, le niveau d'activité des caspases initiatrices 8 et 9 a été mesuré suite à une incubation de trente minutes des Neuro 2A en présence de H_2O_2 (0 à 50 μM). L'activité de la caspase 8 impliquée dans la voie du récepteur de mort n'a pas changé de façon importante, augmentant de moins de 1% à 50 μM (figure 3.3A). Par contre, la caspase 9 impliquée dans la voie mitochondriale, voit son activité augmenter d'environ 10% à 15 et 25 μM de H_2O_2 respectivement comparativement au témoin (figure 3.3B). Le stress oxydatif causé par H_2O_2 active donc la voie mitochondriale de l'apoptose davantage que la voie du récepteur de mort.

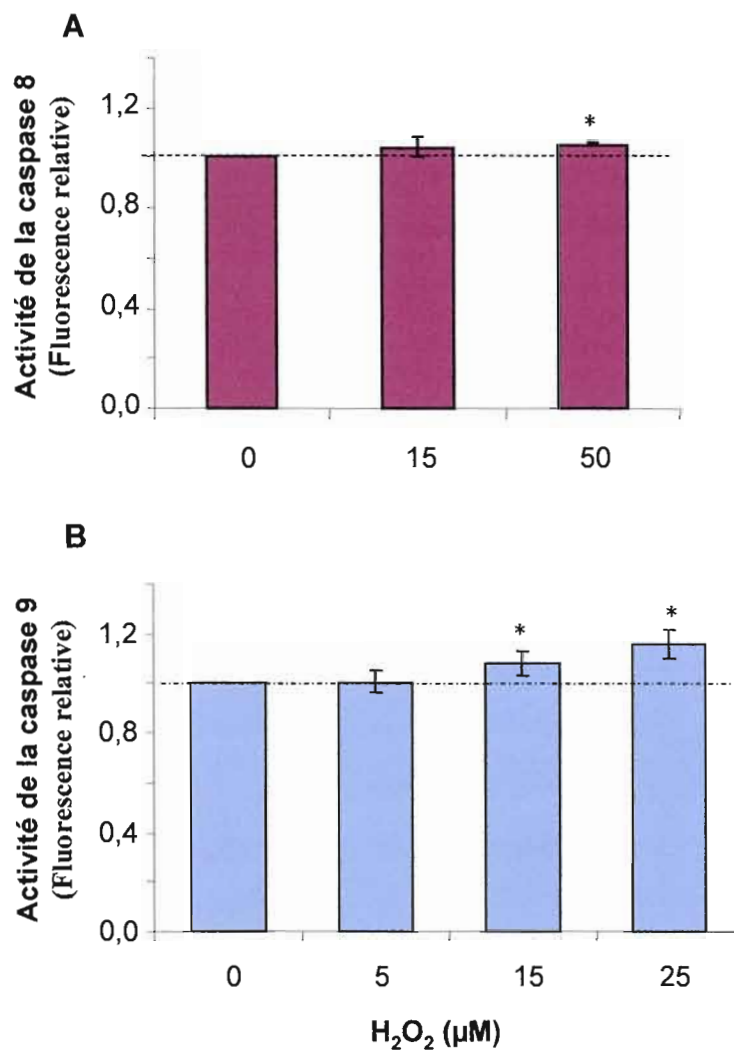


Figure 3. 3: Activité des caspases 8 et 9 dans les cellules Neuro 2A exposées au H₂O₂

Des cellules Neuro 2A ont été incubées à 37°C pendant trente minutes avec différentes concentrations de H₂O₂. L'activité enzymatique de la caspase 8 (A) et de la caspase 9 (B) a été évaluée à l'aide du substrat spécifique à chaque caspase. L'activité caspasique des cellules témoins (non exposées au H₂O₂) a servi de point de référence (1,0). Les résultats (moyenne ± écart-moyen) proviennent de trois expériences pour la figure 3A et de six pour la figure 3B. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins.

4. Le stress thermique induit l'apoptose par l'activation de la caspase 9.

Le niveau d'activité des caspases initiateuses 8 et 9 a aussi été mesuré lors d'un choc thermique (37° à 43°C) de trente minutes dans les cellules Neuro 2A. L'activité de la caspase 8 n'a pas changé entre 37° et 42°C (figure **3.4A**) alors qu'une augmentation d'environ 40% a été mesurée à 43°C. Par contre, la caspase 9 a connu une augmentation d'environ 15% de son activité à 40°C et 42°C comparativement au témoin (figure **3.4B**). Cette augmentation s'est poursuivie pour atteindre 40% à 43°C. Le stress oxydatif causé par choc thermique active donc aussi la voie mitochondriale de l'apoptose.

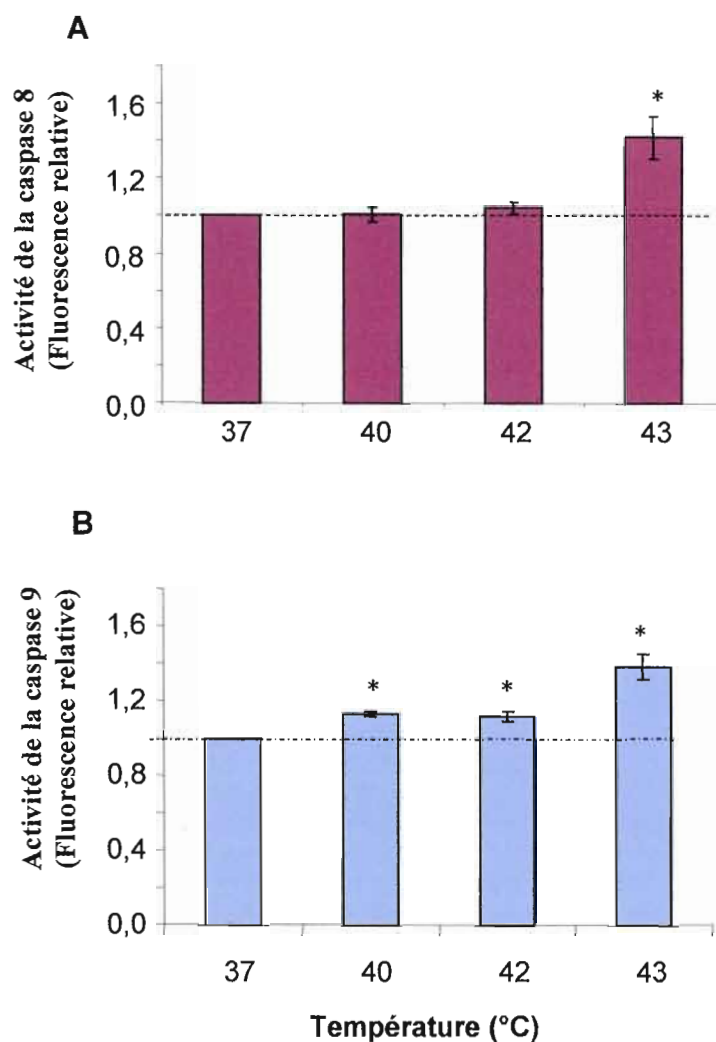


Figure 3. 4:Activité des caspases 8 et 9 dans les cellules Neuro 2A exposées à un choc thermique (37° à 43°C)

Des cellules Neuro 2A ont été incubées à 37°C pendant trente minutes à différentes températures. L'activité enzymatique de la caspase 8 (A) et de la caspase 9 (B) a été évaluée à l'aide du substrat spécifique à chaque caspase. L'activité des cellules témoins (à 37°C) a servi de point de référence (1,0). Les résultats (moyenne \pm écart-moyen) proviennent de trois expériences. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins.

5. Le choc thermique mais non le H₂O₂ active la caspase 3. L'identification de la voie de signalisation de l'induction de l'apoptose suite à l'activation des caspases initiateuses est très importante. Le taux d'activité de la caspase 3 a donc été mesuré et évalué suite à une incubation d'une heure en présence de H₂O₂ (0 à 25µM) ou suite à un choc thermique (37° à 43°C) d'une heure. L'induction d'un stress oxydatif n'a pas occasionné de modification significative de l'activité de la caspase 3 (figure 3.5A). Par contre, l'augmentation de la température a produit une activation de l'enzyme (figure 3.5 B). À 43°C, l'activité caspasique a augmenté d'environ cinq fois comparativement aux cellules témoins. Lorsque les cellules étaient préalablement incubées en présence de l'inhibiteur Bay 11-7082, le taux d'activité de la caspase 3 était plus élevé qu'en absence de prétraitement. À 43°C par exemple, l'inhibiteur a augmenté d'environ vingt fois l'activité caspasique comparativement aux cellules témoins à 37°C et quatre fois par rapport aux cellules stressées mais non prétraitées avec le Bay 11-7082.

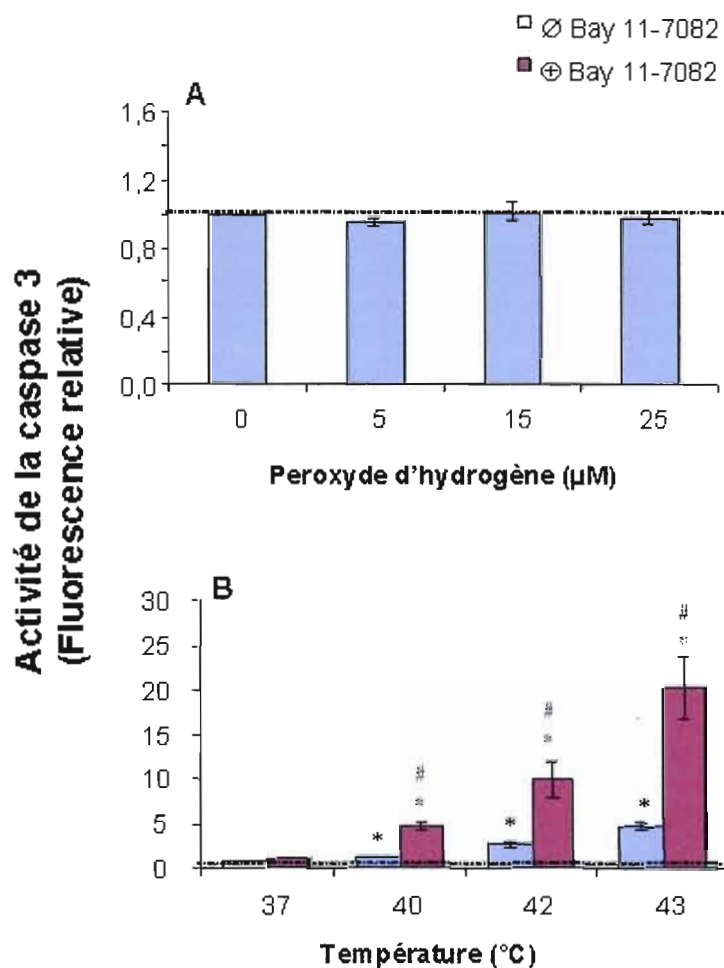


Figure 3. 5: Activité de la caspase 3 suite à un stress oxydatif ou thermique dans les cellules Neuro 2A

Des cellules Neuro 2A, non prétraitées (■) ou prétraitées (■) avec 4 µM de Bay 11-7082 pendant trente minutes, ont été incubées avec différentes concentrations de H₂O₂ (A) ou à différentes températures (B) dans du milieu de culture complet. L'activité enzymatique de la caspase 3 a été évaluée en présence de son substrat spécifique. Les cellules témoins (non stressées et non prétraitées avec le Bay 11-7082) ont servi de point de référence (1,0) pour exprimer l'activité. Les résultats (moyenne ± écart-moyen) proviennent de six expériences indépendantes. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins. # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le Bay 11-7082.

6. Le H_2O_2 mais non le choc thermique active la caspase 6. Le taux d'activité de la caspase 6 a donc été mesuré et évalué suite à une incubation d'une heure en présence de H_2O_2 (0 à $25\mu M$) ou suite à un choc thermique (37° à $43^\circ C$) d'une heure. L'activité de la caspase 6 (figure **3.6A**) a été augmentée d'environ 35% suite à l'induction d'un stress oxydatif par $25\mu M$ de H_2O_2 . Cependant, l'inhibiteur Bay 11-7082 n'a pas modifié cette induction. Suite à un stress thermique à $43^\circ C$, l'activité de la caspase 6 (figure **3.6B**) a diminué d'environ 30% comparativement aux cellules témoins (sans Bay 11-7082 et sans stress) et l'inhibiteur Bay 11-7082 n'a pas empêché cette diminution.

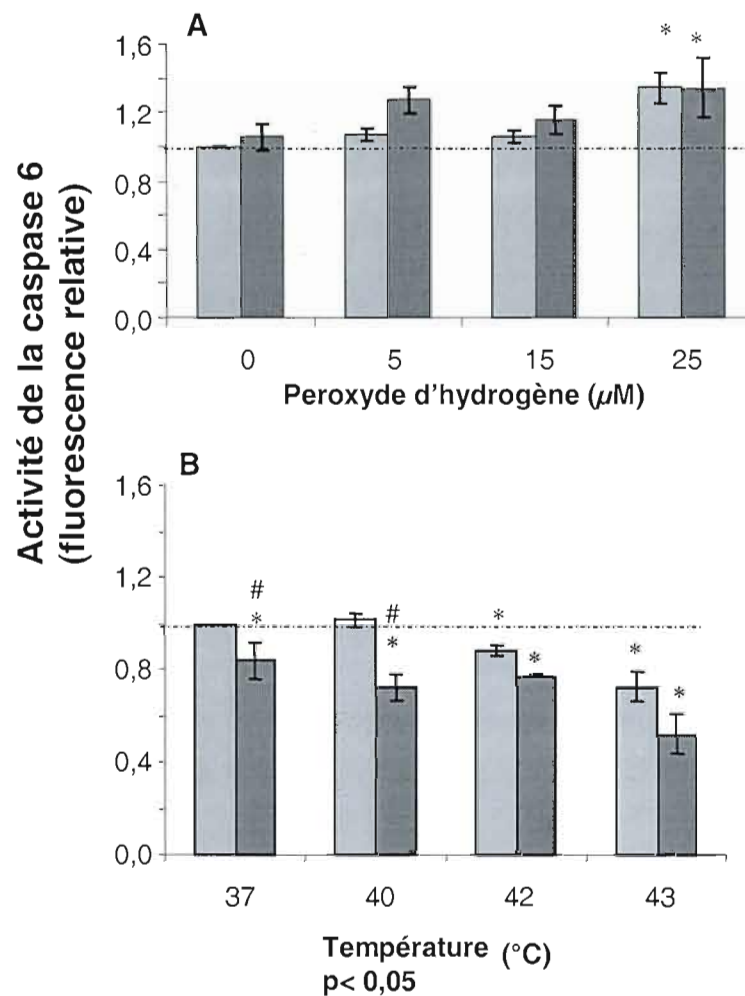
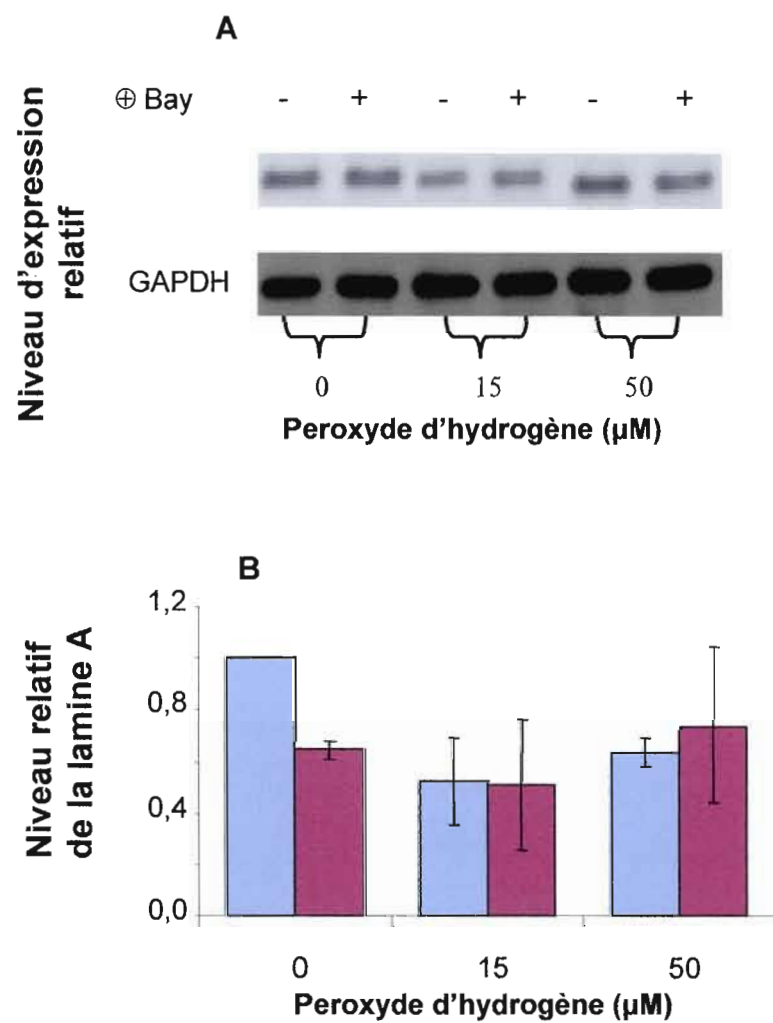


Figure 3. 6: Activité de la caspase 6 suite à un stress oxydatif ou thermique dans les cellules Neuro 2A

Des cellules Neuro 2A, non prétraitées (■) ou prétraitées (■) avec 4 μM de Bay 11-7082 pendant trente minutes, ont été ensuite incubées pendant une heures avec différentes concentration de H_2O_2 (A) ou à différentes températures (B) dans du milieu de culture complet. L'activité enzymatique de la caspase 6 a été évaluée en présence de son substrat spécifique. L'activité des cellules témoins (sans stress et sans Bay) a servi de point de référence (1,0). Les résultats (moyenne \pm écart-moyen) proviennent de six expériences indépendantes. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins. # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le Bay 11-7082.

7. L'activation de la caspase 6 par le H_2O_2 entraîne la diminution de la lamine A. La lamine A est un substrat clivé suite à l'activation de la caspase 6. Le niveau d'expression de la lamine A a donc été évalué suite à une incubation d'une heure en présence de H_2O_2 (0 à $50\mu M$, figure **3.7A**) ou après un choc thermique (37° à $43^\circ C$, figure **3.7C**) par la technique de Western Blot. Lors d'un stress oxydatif, une diminution de 30 à 50% (figure **3.7B**) a été mesurée dès $15\mu M$ de H_2O_2 comparativement aux cellules témoins. L'inhibition de NF- κB n'a pas causé de modification supplémentaire. Cependant, suite à un stress thermique, le taux d'expression de la lamine A (figure **3.7D**) n'est pas modifiée comparativement aux cellules témoins et ce, même lorsque les cellules ont été mises en présence de Bay 11-7082. Ces expériences ont été répétées deux fois avec les mêmes résultats chaque fois. Une troisième répétition aurait permis une analyse statistique de l'ensemble des résultats.



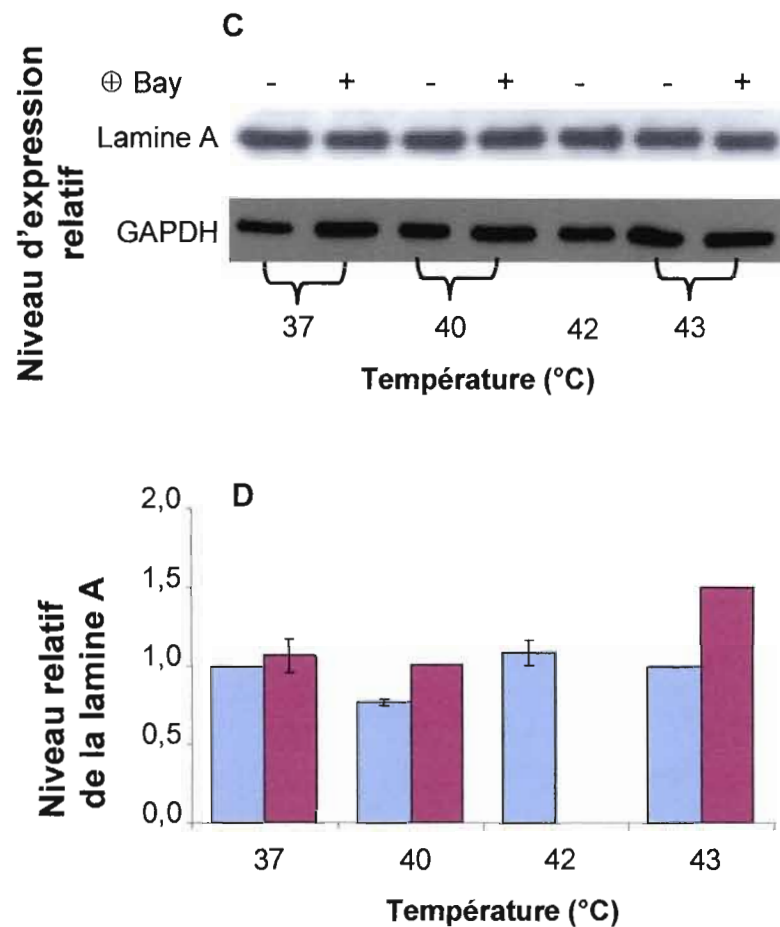


Figure 3. 7: Expression de la lamine A suite un stress oxydatif ou thermique

Des cellules Neuro 2A, non prétraitées (■) ou prétraitées (■) durant trente minutes avec le Bay 11-7082 ont été exposées à du peroxyde d'hydrogène (A et B, 0 à 25 μ M) ou à un choc thermique (C et D, 37° à 43°C) durant une heure. Suite au stress, les protéines cellulaires ont été migrées sur un gel 15% polyacrylamide (en présence de SDS) pour être ensuite transférées sur une membrane de PVDF. Les membranes ont été exposées à un anti-corps reconnaissant la lamine A ainsi qu'à un anticorps reconnaissant la GAPDH (pour normaliser les quantités de protéines sur le gel). Les cellules incubées à 37°C sans prétraitement avec Bay 11-7082 ont servi de point de référence (1,0). En B et D, les résultats (moyenne \pm écart-moyen) proviennent de deux expériences indépendantes.

8. Le H_2O_2 et le choc thermique causent une dépolarisation membranaire mitochondriale. La voie apoptotique mitochondriale ne peut être activée que suite au relâchement du cytochrome C dans le cytosol en réponse à une dépolarisation membranaire de la mitochondrie. La polarité des membranes de la mitochondrie a été analysée par cytométrie de flux. La sonde JC-1 (ratio vert/rouge) a été utilisée pour réaliser ces mesures. Lors d'un stress oxydatif ayant duré une heure, une dépolarisation de 10% et de 15% a été mesurée respectivement à 15 et 25 μM de H_2O_2 (figure **3.8A**), mais cette dépolarisation n'est pas significative. Suite à l'induction d'un stress thermique d'une heure, une dépolarisation de 10% à 40°C, de 30% à 42°C et de près de 50% à 43°C a été mesurée (figure **3.8B**). Dans les deux types de stress, l'inhibition de NF- κ B n'a pas modifié de façon importante la polarité des membranes de la mitochondrie. Le Fccp a été utilisé comme contrôle positif de la dépolarisation des mitochondries.

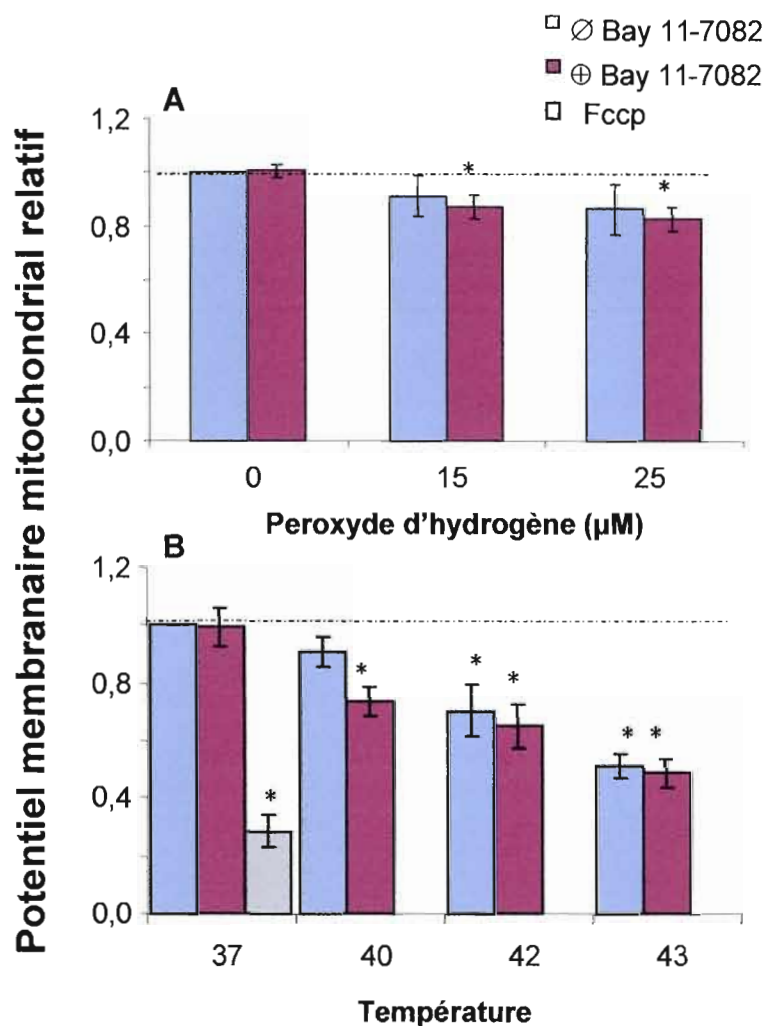


Figure 3. 8: Analyse de la polarité membranaire de la mitochondrie suite à l'induction d'un stress oxydatif ou thermique dans les Neuro 2A.

Des cellules Neuro 2A non prétraitées (■) ou prétraitées (■) pendant trente minutes avec le Bay 11-7082 ont été ensuite exposées à du peroxyde d'hydrogène (A, 0 à 25 μM) ou à un choc thermique (B, 37° à 43°C) durant une heure. Le Fccp (■) a été utilisé comme contrôle positif de dépolarisation. Les cellules ont été incubées durant trente minutes en présence de JC-1 suivant le stress et ensuite mises en présence de PI. La fluorescence des cellules témoins (sans stress et sans Bay) a servi de point de référence (1,0). Les résultats (moyenne ± écart-moyen) proviennent de six expériences indépendantes pour la figure 7A et de dix pour la figure 7B. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins

IV Discussion et conclusion

La recherche a pour but ultime de découvrir et d'expliquer de nombreux phénomènes nébuleux. Par ce fait même, il est possible d'entrevoir que les découvertes qui en découlent pourraient entraîner des améliorations de l'existence de l'être humain. Dans le cas de la recherche biomédicale, le but visé est de comprendre le développement de pathologies et de maladies interférant dans la vie des gens pour leur permettre ultimement de guérir et d'avoir des jours meilleurs. Ce présent projet contribue à la recherche fondamentale en étudiant les voies de signalisation de l'apoptose dans une lignée neuronale. Il a aussi pour but de mieux comprendre le développement des maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer ainsi que d'ouvrir la voie à la mise au point de nouveaux traitements préventifs ou curatifs de la maladie [4, 17]. Une importante quantité de protéines et de lipides oxydés a été observée dans les neurones des patients affectés par la maladie d'Alzheimer [24]. Le stress oxydatif est capable d'endommager les neurones et de promouvoir l'apoptose en générant de grandes quantités de protéines et de lipides oxydées. La synthèse de ROS peut entraîner une diminution de l'absorption de glutamate par les cellules neurales. Les ROS sont aussi capables d'inhiber la glutamine-synthétase qui est une enzyme responsable de l'enlèvement de l'ammoniaque toxique produit par l'activité neuronale [82]. Cela nous a menés à vouloir élucider la voie de signalisation de l'apoptose due à un stress oxydatif et apporter une meilleure compréhension de son implication dans la maladie d'Alzheimer [9, 59].

Le cerveau étant un organe difficilement accessible pour les thérapies anticancérigènes, l'étude des voies d'activation de l'apoptose pourrait entraîner le développement de nouveaux traitements anti-tumoraux moins agressants envers les tissus environnants [15, 18]. La thermothérapie s'avère être un nouveau traitement

possible dans le cas de certains cancers répondant mal aux traitements usuels. Étant très peu invasive, son application laisse croire qu'elle pourrait être utilisée pour traiter certains types de cancers du cerveau. De cette idée, nous avons voulu éclaircir, dans une souche neuronale, la voie de signalisation de l'apoptose lors d'un stress thermique. Une augmentation de la présence de NF- κ B a été rapportée depuis quelques années dans certains types de cancers ainsi que dans la maladie d'Alzheimer [13, 14, 15, 17]. Nous avons donc profité de l'occasion pour tenter de mettre en lumière l'implication de ces facteurs de transcription lors de l'induction de l'apoptose suite à un stress oxydatif ou thermique et d'ouvrir la voie à traitement de ces maladies.

Lors de nos expériences nous avons pu élucider certains phénomènes de l'induction de l'apoptose dans les Neuro 2A suite à un stress oxydatif ou thermique (tableau 5.1).

Tableau 5. 1 :Résumé des résultats obtenus suite aux divers stress chez les cellules Neuro 2A

Paramètre	Stress oxydatif	Choc thermique
Hoescht/PI	Condensation de la chromatine Nécrose légère Accentuation inexistante ou légère par Bay	Condensation de la chromatine Nécrose légère Accentuation inexistante ou légère par Bay
Dépolarisation mitochondriale	Tendance non-significative Accentuation légère par Bay	Oui Accentuation inexistante ou légère par Bay
Caspases initiatrices	Caspase 8 peu ou pas activée Effet de Bay non analysé Caspase 9 activée Pas d'effet apparent pour Bay (non montré)	Caspase 8 peu ou pas activée Effet de Bay non analysé Caspase 9 activée Pas d'effet apparent pour Bay (non montré)
Caspases effectrices	Caspase 3 non activée Pas d'effet apparent pour Bay (non montré) Caspase 6 activée Pas d'effet par Bay	Caspase 3 activée Accentuation importante par Bay Caspase 6 non activée (inhibition) Bay peut accentuer l'inhibition
Diminution de la lamine A (résultats préliminaires)	Oui Peu ou pas d'effet par Bay	Non Peu ou pas d'effet par Bay

Les résultats de la condensation de la chromatine ont démontré qu'il y avait induction de l'apoptose lors de l'exposition des cellules Neuro 2A à un stress oxydatif ou à un stress thermique. Dans le cas du stress oxydatif, le taux d'apoptose augmente entre les concentrations de 0 à 25 μM pour ensuite diminuer lentement et revenir au même taux que le contrôle à 50 μM . Cette courbe confirme que les concentrations utilisées se trouvent dans la fenêtre étroite de l'induction de l'apoptose. À des concentrations de peroxyde d'hydrogène plus élevées, il y a induction de la nécrose dans les cellules et éclatement de celles-ci. Cela explique qu'aucune augmentation du taux de nécrose entre les concentrations de 35 à 50 μM ne soit enregistrée. En présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 (4 μM), nous avons observé une tendance à une activation légèrement plus hâtive de l'apoptose à 15 μM de H_2O_2 ainsi qu'un décroissement plus lent de 25 à 50 μM . Cela nous laisse penser que l'inhibition de NF- κB lors d'un stress oxydatif pourrait favoriser l'induction de l'apoptose à des concentrations de peroxyde plus élevées, permettant ainsi la survie des tissus environnants. L'application d'un tel phénomène pourrait s'avérer utile face à un cancer résistant aux médicaments, puisque l'inhibition de NF- κB favorise l'activation de l'induction de l'apoptose et non de la nécrose. Cela permet l'utilisation d'une dose du médicament plus importante tout en visant l'apoptose tumorale et de diminuer le phénomène d'inflammation localisée lors des traitements.

En ce qui a trait au choc thermique, les résultats obtenus révèlent une corrélation entre l'augmentation de la température et le taux d'apoptose jusqu'à 43°C. Une élévation du taux de nécrose a surtout été observée à 43°C, ce qui nous permet de spéculer que l'induction de l'apoptose s'effectue entre 37° et 43°C, et qu'à des températures plus élevées, il y aurait induction de nécrose. Durant le stress thermique, la présence de l'inhibiteur de NF- κB entraîne, à 42°C, un taux d'apoptose plus élevé. Cependant, chez les cellules traitées par Bay 11-7082, le taux d'induction

de l'apoptose à 43°C est substantiellement moins élevé que dans les cellules non traitées, mais le taux de nécrose s'est avéré beaucoup plus élevé lors du stress thermique en présence de l'inhibiteur. Ces résultats démontrent que, lors d'un stress thermique dans des cellules neuronales, NF- κ B joue un rôle très important dans la survie cellulaire et que son inhibition fragilise les cellules, entraînant ainsi une augmentation du taux d'induction de nécrose. Les données recueillies permettent d'imaginer un traitement combinant l'effet de l'inhibition de NF- κ B à un stress thermique léger (42°C) pour induire l'apoptose dans des cancers neuronaux. Il est cependant important de mettre en évidence que l'inhibition de NF- κ B lors d'un stress thermique ou oxydatif n'entraîne pas la même réponse cellulaire en ce qui a trait à l'apoptose. Il est donc indispensable d'éclairer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces deux phénomènes.

La compréhension de la voie de signalisation de l'apoptose est très importante pour identifier les facteurs moléculaires impliqués. L'activité enzymatique des caspases initiatrices durant un stress thermique ou oxydatif a été mesurée et a permis d'identifier l'activation de la caspase 9. L'étude de la polarité des membranes des mitochondries a mis en évidence que le clivage de la pro-caspase 9 est dû à l'activation de la voie mitochondriale. La présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 n'a entraîné aucune modification observable quant à la dépolarisation des membranes de la mitochondrie suite à un stress oxydatif ou thermique. De plus, aucun effet de l'inhibiteur n'a été observé lors de la mesure de l'activité de la caspase 9 (résultats non présentés). Ces informations sont essentielles à l'identification des interactions possibles entre les caspases et NF- κ B chez les cellules neuronales, ainsi que pour développer de meilleurs traitements contre un cancer caractérisé par une suractivité de NF- κ B [15, 19].

Une fois l'identification de la caspase initiatrice effectuée, nous avons mis en évidence la voie effectrice de l'apoptose dans les cellules Neuro 2A. Suite à un stress oxydatif, l'activation de l'apoptose s'effectue dans la plupart des lignées cellulaires (telle celle des PC12) par la caspase 3 [2-6]. Cependant dans le présent travail avec des Neuro 2A, c'est la caspase 6 qui est activée suite à ce stress tandis que la 3 n'est pas recrutée pour l'induction de l'apoptose. Ces résultats soulèvent la possibilité d'une voie d'activation directe entre les caspases 9 et 6, ce qui a été rapporté dans divers types cellulaires mais non dans un type neuronal [4]. Encore une fois, la présence de l'inhibiteur Bay 11-7082 n'entraîne aucune modification du taux d'activité de la caspase 6. Il n'y aurait aucun lien entre l'induction de l'apoptose par la caspase 6 et NF- κ B lors d'un stress oxydatif. Donc lors de ce stress, l'effet de l'inhibition de NF- κ B sur l'apoptose serait caspase indépendant et agirait à un niveau inconnu durant l'induction de l'apoptose.

Suite à une hyperthermie contrôlée, l'induction de l'apoptose dans les Neuro 2A s'effectue, selon nos résultats, par l'activation de la pro-caspase 3. Ces résultats sont conformes avec la littérature qui établit qu'habituellement, la caspase 9 clive la caspase 3 et que celle-ci peut activer à son tour d'autres caspases effectrices telles la 6 ou la 7 [3, 5, 6]. Le prétraitement avec l'inhibiteur, a permis d'observer une augmentation impressionnante de l'activité de la caspase 3 par rapport aux cellules non prétraitées. Cette augmentation de l'activité de la caspase 3 laisse croire à un lien entre NF- κ B et la caspase 3, et que celui-ci agirait comme facteur de survie suite à un stress thermique. Étant donné que NF- κ B est un groupe de facteurs de transcription, il serait intéressant d'être en mesure de déterminer quelles protéines cibles des NF- κ B sont responsables de cette inhibition et par quel membre de la famille de NF- κ B elles sont synthétisées. En ce qui concerne la caspase 6, une baisse significative de l'activité a été mesurée lors d'un choc thermique, et ce, de façon encore plus

prononcée en présence de l'inhibiteur. Ces résultats pourraient s'expliquer par une instabilité de la caspase 6 dans sa conformation tertiaire accrue lors du choc thermique entraînant une dénaturation et donc, l'inhibition de son activité.

L'identification des voies de signalisation suite à l'induction de l'apoptose est un domaine très important de la recherche fondamentale, puisque chaque type cellulaire répond différemment à un stress et que le cancer est constitué d'une multitude de cellules hétérogènes. Notre étude a permis de mettre en lumière l'influence de NF- κ B lors de deux stress induisant l'apoptose dans une lignée neuronale. Nous avons démontré que ce facteur de transcription était anti-apoptotique et légèrement impliqué suite à un stress oxydatif, mais que son rôle ne se situait pas dans l'inhibition de l'activation des caspases 9, 8 et 6, mais à un autre niveau inconnu. Lors du choc thermique, NF- κ B tient un rôle de promoteur de la survie cellulaire en agissant sur l'inhibition de l'activation de la caspase 3.

Nous avons été capables de mettre en évidence que, durant un stress oxydatif, l'apoptose est induite suite à l'activation de la voie mitochondriale et se poursuit par l'activation de la caspase 9 suivie par celle de la caspase 6, cependant il n'a pas été possible de démontrer par la technique de buvardage Western le clivage des pro-caspases en caspases actives. Il serait donc intéressant afin d'avoir une meilleure appréciation des données recueillies d'être en mesure de visualiser cette activation ainsi que de démontrer la relocalisation nucléaire de NF- κ B.

Malheureusement, les résultats obtenus ne permettent pas de faire une relation cause à effet entre l'induction de l'apoptose dans la maladie d'Alzheimer et la présence de peroxyde d'hydrogène et de NF- κ B. Cependant, il est trop tôt pour exclure toute implication de NF- κ B dans l'Alzheimer. Chez le patient atteint d'Alzheimer, les neurones sont exposés durant de longues périodes à de grandes concentrations de protéines et de lipides oxydés ainsi qu'à un phénomène d'inflammation localisé entraînant une concentration anormalement élevée de NF- κ B à l'intérieur des cellules. Il va sans dire que de nombreuses études seront nécessaires pour permettre d'élucider le phénomène de la perte neuronale lors de cette maladie.

En ce qui a trait à l'induction de l'apoptose suite à une hyperthermie contrôlée, nos résultats ont permis d'identifier la voie de signalisation apoptotique. Ainsi, lors de ce stress, il y a activation de la voie mitochondriale qui, par la suite, active la caspase 9 ainsi que la 3. De plus, l'inhibition du facteur de NF- κ B augmente l'apoptose à une température de 42°C, ainsi que l'activité de la caspase 3. Ces résultats démontrent que cette thérapie, beaucoup moins invasive que les thérapies conventionnelles, pourrait être fort utile dans le traitement d'un cancer neuronal. Cependant, de nombreuses autres études seront nécessaires pour comprendre l'augmentation du taux de nécrose à 43°C et pour identifier les molécules impliquées dans l'inhibition de l'activation de la pro-caspase 3 et de son lien avec NF- κ B.

Grâce à ce projet, les voies de signalisation de l'apoptose lors de ces deux stress dans une lignée neuronale sont maintenant plus claires. Suite au choc thermique, plusieurs études ont démontré une augmentation de la synthèse des HSP. L'identification dernièrement de leur implication dans divers types de cancer et dans

la maladie d'Alzheimer laisse penser qu'une étude de l'interaction entre les HSP et NF- κ B dans le développement de la carcinogenèse et dans la stabilisation des amas de protéines β -améloïdes serait une avenue très prometteuse.

Notre espoir est que cette étude a permis d'éclaircir, suite à certains stress, les voies de signalisation de l'apoptose et du rôle de NF- κ B dans une lignée neuronale. Les populations humaines ayant une espérance de vie toujours plus longue, la recherche sur les maladies affectant les aînés devient de plus en plus importante pour permettre à tous d'avoir une vie saine le plus longtemps possible.

V. Bibliographie

1. Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. (2001). **Immunologie**. Dunod (ed 4^e), Paris p31-35
2. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). **Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implication in Tissue Kinetics**. Br. J. Cancer **26**: 239-257
3. Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. (1999). **Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates and Functions During Apoptosis**. Annu Rev Biochem **68**: 383-424
4. Nijhawan D., Honarpour N., Wang X. (2000). **Apoptosis in Neural Development and Disease**. Annu Rev Neurosci **23**: 73-87
5. Wang Z., Liu Y., Cui Y. (2005). **Pathways to caspase activation**. Cell Biology International **29**: 489-496
6. Stennicke H., Salvesen G. (1997). **Biochemical Characteristics of Caspases-3, -6, -7, and -8**. J Biol Chem **41**: 25719-25723
7. Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H.(2005). **Caspases: pharmacological manipulation of cell death**. J Clin Invest. **115**: 2665-2672
8. Köhler C., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2002). **Evaluation of Caspase Activity in Apoptotic Cell**. J Immunol Methods **265**: 97-110

9. Ding W., Ong C. (2003) **Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Changes in Cyanobacteria-induced Apoptosis and Hepatotoxicity.** FEMS. **220**: 1-7

10. O'Neil L., Kaltschmidt C. (1997). **NF- κ B: a Crucial Transcription Factor for Glial and Neuronal Cell Function.** Trends Neurosci **20**: 252-258

11. Schlesinger M. (1994). **How the Cell Copes with Stress and the Function of Heat Shock Proteins.** Pediatr. Res. **36**: 1-6

12. Erlandsson N., Baumann B., Rössler O., Kaufmann K., Gieh K., Wirth T., Thiel G. (2002). **Lack of Correlation Between NF- κ B Activation and Induction of Programmed Cell Death in PC12 Pheochromocytoma Cells Treated with 6-hydroxydopamine or Cannabinoid Receptor 1-agonist CP55,940.** Biochem Pharmacol **64**: 487-495

13. Kolenko V., Bloom T., Rayman P., Bukowski R., His E., Finke J. (1999). **Inhibition of NF- κ B Activity in Human T Lymphocytes Induces Caspase-Dependent Apoptosis without Detectable Activation of Caspase-1 and -3.** J Immunol **163**: 590-598

14. Chen L., Greene W.C. (2004). **Shaping the Nuclear Action of NF- κ B.** Nat Rev Mol Cell Biol. **5**: 392-401

15. Luo J., Kamata H., Karin M. (2005). **IKK/NF- κ B Signaling: Balancing Life and Death, a New Approach to Cancer Therapy.** J Clin Invest **115**: 2625-2632

16. Kaltschmidt B., Uhrek M., Volk B., Baeuerle P. A., Kalschmidt C. (1997). **Transcription Factor NF- κ B is Activated in Primary Neurons by Amyloid β Peptides and in Neurons Surrounding Early Plaques from Patients with Alzheimer Disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2642-2647

17. Wang Y., Chan S., Tsang B. (2002). **Involvement of Inhibitory Nuclear Factor-kappaB (NFkappaB)-independent NFkappaB Activation in the Gonadotropic Regulation of X-linked Inhibitor of Apoptosis Expression during Ovarian Follicular Development *in vitro*.** *Endocrinology* **143**: 2732-2740

18. Mitsiades N., Mitsiades C., Poulaki V., Chauhan D., Richardson P., Hideshima T., Munshi N., Treon S., Anderson K. (2002). **Biologic Sequelae of Nuclear Factor- κ B Blockade in Multiple Myeloma: Therapeutic Applications.** *Blood* **99**: 4079-4086

19. Luo J., Kamata H., Karin M. (2005). **The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling.** *J Clin Immunol.* **25**: 541-550

20. Bian, X., et al. (2001). **NF-kappa B Activation Mediates Doxorubicin-induced Cell Death in N-type Neuroblastoma Cells.** *J. Biol. Chem.* **276**: 48921–48929.

21. Hettmann, T., DiDonato, J., Karin, M., and Leiden, J.M. (1999). **An Essential Role for Nuclear Factor kappaB in Promoting Double Positive Thymocyte Apoptosis.** *J. Exp. Med.* **189**: 145–158.

22. Calabrese V., Scapagnini G., Colombrita C, Galli F., Butterfield D.(2003). **Redox Regulation of Heat shock Protein Expression in Aging and Neurodegenerative Disorders Associated with Oxidative Stress: A Nutritional Approach** Amino Acids **25**: 437–444.
23. Dolcet X., Llobet D., Pallares J., Matias-Guiu X. (2005). **NF- κ B in Development and Progression of Human Cancer.** Virchows Arch **446**: 475–482
24. Behl C. (1999). **Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: Implication for Novel Therapeutic Approaches.** Prog Neurobiol **57**: 302-318
25. Butterfield D., Castegna A., Lauderback C., Drake J. (2002). **Evidence that Amyloid Beta-peptide-induced Lipid Peroxidation and its Sequelae in Alzheimer's Disease Brain Contribute to Neuronal Death.** Neurobiol Aging **23**: 655–664
26. Nunomura A., Chiba S., Lippa C., Cras P., Kalaria R., Takeda A., Honda K., Smith M., Perry G. (2004). **Neuronal RNA Oxidation is a Prominent Feature of Familial Alzheimer's Disease.** J. Neurobiol Disease. **17**: 108-113
27. Poirier J. (2005). **Apolipoprotein E, Cholesterol Transport and Synthesis in Sporadic Alzheimer's Disease.** J. Neurobiol Aging. **26**: 355-361.
28. Maccioni R.B., Muñoz J.P., Barbeito L. (2001). **The Molecular Base of Alzheimer's Disease and other Neurodegenerative Disorders.** Arch Med Res **32**: 367-381

29. LeBlanc A., Liu H., Goodyeri C., Bergeron C., Hammond J. (1999). **Caspase-6 Role in Apoptosis of Human Neurons, Amyloidogenesis, and Alzheimer's Disease.** *J Biol Chem* **274**: 23426–23436
30. Eehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K. (2003). **Amyloidogenic Processing of the Alzheimer-amyloid Precursor Protein Depends on Lipid Rafts.** *J Cell Biol* **160**: 113-123
31. Farrer, L., Cupples, L., Haines, J., Hyman, B., Kukull, W., Mayeux, R., Myers, R., Pericak-Vance, M., Risch, N., Van Duijn, C. (1997). **Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. A Meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium.** *JAMA.* **278** 1349–1356
32. Nicoll, J., Roberts, G., Graham, D. (1996). **Amyloid Beta-protein, APOE Genotype and Head Injury.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **777**: 271–275
33. Teasdale, G., Nicoll, J., Murray, G., Fiddes, M. (1997). **Association of Apolipoprotein E Polymorphism with Outcome after Head Injury.** *Lancet* **350**: 1069–1071
34. Jordan, B., Relkin, N., Ravdin, L., Jacobs, A., Bennett, A., Gandy, S. (1997). **Apolipoprotein E-epsilon4 Associated with Chronic Traumatic Brain Injury in Boxing.** *J. Am. Med. Assoc.* **278**: 136–140
35. McCarron, M., DeLong, D., Alberts, M. (1999). **APOE Genotype as a Risk Factor for Ischemic Cerebrovascular Disease: a Meta-analysis.** *Neurology* **53**: 1308–1311

36. Friedman, G., Froom, P., Sazbon, L., Grinblatt, I., Shochina, M., Tsenter, J., Babaey, S., Yehuda, A., Groswasser, Z. (1999). **Apolipoprotein E-epsilon4 Genotype Predicts a Poor Outcome in Survivors of Traumatic Brain Injury.** *Neurology* **52**: 244–248

37. Crawford, F, Vanderploeg, R., Freeman, M., Singh, S., Waisman, M., Michaels, L., Abdullah, L., Warden, D., Lipsky, R., Salazar, A., et al. (2002). **APOE Genotype Influences Acquisition and Recall Following Traumatic Brain Injury.** *Neurology* **58**: 1115–1118

38. Chamelian, L., Reis, M., Feinstein, A. (2004). **Six Month Recovery from Mild to Moderate Traumatic Brain Injury: the Role of APOE-epsilon4 Allele.** *Brain* **127**: 2621–2628

39. Harhangi, B., de Rijk, M., van Duijn, C., Van Broeckhoven, C., Hofman, A., Breteler, M. (2000). **APOE and the Risk of PD with or without Dementia in a Population-based Study.** *Neurology* **54**: 1272–1276

40. Martinez, M., Brice, A., Vaughan, J., Zimprich, A., Breteler, M., Meco, G, et al. (2005). **Apolipoprotein E4 is Probably Responsible for the Chromosome 19 Linkage Peak for Parkinson's Disease.** *Am. J. Med. Genet.* **136B**: 72–74

41. Fazekas, F., Strasser-Fuchs, S., Kollegger, H., Berger, T., Kristoferitsch, W., et al. (2001). **Apolipoprotein E-epsilon 4 is Associated with Rapid Progression of Multiple Sclerosis.** *Neurology* **57**: 853–857

42. Chapman, J., Vinokurov, S., Achiron, A., Karussis, D., Mitosek-Szewczyk, K., Birnbaum, M., Michaelson, D., Korczyn, A. D. (2001). **APOE Genotype is a Major Predictor of Long-term Progression of Disability in MS.** *Neurology* **56**: 312–316
43. Bedlack, R., Edelman, D., Gibbs, J., Kelling, D., Strittmatter, W., Saunders, A. M., Morgenlander, J. (2003). **APOE Genotype is a Risk Factor for Neuropathy Severity in Diabetic Patients.** *Neurology* **60**: 1022–1024
44. Mahley R., Weisgraber K., Huang Y. (2006). **Apolipoprotein E4: A Causative Factor and Therapeutic Target in Neuropathology, Including Alzheimer's Disease.** *PNAS* **103**: 5644–5651
45. Ramassamy C., Krzywkowski P, Averill D, Lussier-Cacan S, Theroux L, Christen Y, Davignon J, Poirier J. (2001) **Impact of ApoE Deficiency on Oxidative Insults and Antioxidant Levels in the Brain.** *B. Res.* **86**: 76-83
46. Mahley, R. (1988). **Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology** *Science* **240**: 622–630
47. Mahley, R., Rall, S. (2000). **Apolipoprotein E: far more than a Lipid Transport Protein.** *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **1**:507–537
48. Weisgraber, K., Mahley, R. (1996). **Human Apolipoprotein E: the Alzheimer's Disease Connection.** *FASEB J.* **10**: 1485–1494
49. Desjardins P, Ledoux S (1998). **The Role of Apoptosis in Neurodegenerative Diseases.** *Metab Brain Dis* **13**:79-96

50. Loo D., Copani A., Pike C., Whittemore E., Walencewicz A., Cotman C. (1993). **Apoptosis is Induced by β -Amyloid in Cultured Central Nervous System Neurons.** Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 7951-7955

51. LeBlanc A. (2005). **The Role of Apoptotic Pathways in Alzheimer's Disease Neurodegeneration and Cell Death.** Curr Alzheimer Res. **4**: 389-402

52. Reddy P., Beal M. (2005) **Are Mitochondria Critical in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease?** Brain Res. Rev. **49**: 618-632

53. Kim H., Lee J., Lee J., Kim E., Chang K., Park C., Jeong S., Suh Y. (2002) **Amyloid beta Peptide Induces Cytochrome C Release from Isolated Mitochondria.** Neuro Report **13**: 1989-1993.

54. Green K.N., Peers C. (2002). **Divergent Pathways Account for Two Distinct Effects of Amyloid β Peptides on Exocytosis and Ca^{2+} Currents: Involvement of ROS and NF- κ B.** J Neurochem. **81**: 1043-1046

55. Butterfield D., Drake J., Pocernich C., Castegna A. (2001) **Evidence of Oxidative Damage in Alzheimer's Disease Brain: Central role for Amyloid β -peptide.** TRENDS in Molecular Medicine **12**: 548-554

56. Lukiw W., Pappolla M., Pelaez R., Bazan N. (2004). **Alzheimer's Disease, A Dysfunction in Cholesterol and Lipid Metabolism.** Cellular and Molecular Neurobiology, **25**: 475-783

57. Butterfield D.A. (2003). **Proteomics: a New Approach to Investigate Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain.** Brain Res **1000**: 1-7
58. Butterfield D., Lauderback C. (2002) **Serial Review: Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease.** Free Radical Biology & Medicine **11**: 1050-1060
59. Marques C.A., Keil U., Bonert A., Steiner B., Haass C., Müller W.E., Eckert A. (2003). **Neurotoxic Mechanisms Caused by the Alzheimer's Disease-linked Swedish APP Mutation: Oxidative stress, Caspases and JNK Pathway.** J Biol Chem **278**: 28294-28302
60. Butterfield D., Castegna A. (2003) **Proteomics for the Identification of Specifically Oxidized Proteins in Brain: Technology and Application to the Study of Neurodegenerative Disorders.** Amino Acids. **25**: 419–425
61. Keller J., Hanni K.B., Markesberry W.M. (2000). **Impaired Proteasome Function in Alzheimer's Disease.** J. Neurochem **75**: 436-439
62. Shringarpure R., Grune T., Davies K.J. (2001). **Protein Oxidation and 20S Proteasome-dependent Proteolysis in Mammalian Cells.** Cell Mol. Life Sci. **58**: 1442-1450
63. Calderwood S., Khaleque A., Sawyer D., Ciocca D. (2006). **Heat Shock Proteins in Cancer: Chaperones of Tumorigenesis.** Trends Biochem Sci **31**: 164-172
64. Soti C., Nagy E., Giricz Z., Vigh, L., Csermely P., Ferdinandy P.(2005). **Heat Shock Proteins as Emerging Therapeutic Targets.** British J. of Pharmacology **146**: 769–780

65. Mayer RJ (2003). **From Neurodegeneration to Neuro-homeostasis: the Role of Ubiquitin**. *Drug News Perspect* **16**: 103–108
66. Campbell N., Mathieu R. (1995). **Biologie**. Renouveau Pédagogique Inc. (ed 3^e), Canada p235-237 ; 384-386
67. Rosso S., Mac K., Zanetti R. (1994). **Sun Exposure, UVA Lamps and Risk of Skin Cancer: Epidermiological Studies**. *Eur.J. Cancer* **30**: 355-552
68. Statistics Canada. (2006) **Cancer Statistics**. Ottawa: Health Statistics Division, Catalogue 84-601-X1E
69. Parkin D., Muir C., Whelan S., Gao Y. (1997) **Cancer incidence in five continents, volume VII**. Lyon: IARC Scientific Publication No. **143**, International Agency for Research on Cancer
70. Dote H., Burgan W., Camphausen K., Tofilon PJ. (2006) **Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation**. *Cancer Res.* **18**: 9211-9220
71. Quan T., States J. (1996). **Preferential DNA Damage in the p53 Gene by Benzo(a)pyrene Metabolites in CYP1A1 Expressing *Xeroderma pigmentosum* Group A cells**. *Mol Carcinog* **16**: 32-43
72. Stephens M., Siroonian J. (1998) **Smoking prevalence, quit attempts and successes**. *Health Reports* **9**: 31-37.

73. Tanel D., Averill D. (2005) **The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway.** BBA **1743**: 255-267
74. Mai H., May W., Fengqin G., Zhaohui J., Xingming D. (2003). **A Functional Role for Nicotine in Bcl-2 Phosphorylation and Suppression of Apoptosis.** J. Chem. **27**: 1886-1891
75. Kim N., Piatsysek M., Shay J. (1994). **Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer.** Science **226**: 2011-2015
76. Greten, F.R. (2004). **IKKbeta Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-associated Cancer.** Cell **118**: 285–296.
77. Pikarsky, E., et al. (2004). **NF-kappaB Functions as a Tumour Promoter in Inflammation-associated Cancer.** Nature. **431**: 461–466.
78. Olmsted J., et al. (1970) **Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. **65**: 129-136
79. Calderón F., Bonnefont A., Muñoz F., Fernández V., Videla L., Inestrosa N. (1999) *PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide.* J. Neurosci. Res. **56**:620-631,
80. Samali A. Robertson J., Orrenius S et al. (1999) **Presence of Pro-apoptotic Complex of Procaspase 3, Hsp 60 and HSP 10 in the Mitochondrial Fraction of Jurkat Cells.** EMBO J. **18**: 2040-2048

81. Mancini M., Anderson B., Caldwell E., Sedghinasab M., Paty P., Hockenbery D. (1997) **Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line.** *J. Cell Biol.* **2**: 449-469
82. Knorpp T., Robinson S., Crack P., Dringenl R. (2006) **Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress.** *J Neural Transm.* **113**: 1145-1155.